

Manuela Kögler

**Untersuchungen zur
genomischen Struktur des
menschlichen Inter-alpha-Trypsininhibitors**

Disbui. München

1989

AV-Verlag

Untersuchungen zur genomischen Struktur des menschlichen
Inter-alpha-Trypsininhibitors

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Manuela Kögler
aus K a r l s r u h e

München, 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schmieger
- Sondergutachter: Prof. Dr. H. Fritz

eingereicht am: 10. 11. 1988

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 3. 1989

Manuela Kögler

**Untersuchungen zur
genomischen Struktur des
menschlichen Inter-alpha-Trypsininhibitors**

CIP-Titelaufnahme der Deutschen Bibliothek

Kögler, Manuela:

Untersuchungen zur genomischen Struktur des menschlichen
Inter-alpha-Trypsininhibitors / Manuela Kögler. -Augsburg :
AV-Verl., 1989

Zugt.: München, Univ., Diss., 1988
ISBN 3-925274-24-3

Alle Rechte vorbehalten
AV-Verlag, Augsburg 1989

Verlagsanschrift:
AV-Verlag
Schroeckstraße 8
8900 Augsburg

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. H. Fritz angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Fritz danke ich für die wohlwollende Unterstützung und Förderung.

Herrn Dr. W. Gebhard danke ich für die Bereitstellung des Themas.

Herrn Prof. Dr. H. Cleve danke ich für die Vertretung der Arbeit vor der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München.

Besonders verbunden bin ich Frau Dr. Madlen Wollersheim, deren Engagement, Anteilnahme und Diskussionsbereitschaft sehr zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Herrn Laust Østergaard danke ich für viele wissenschaftliche Gespräche.

Herrn Dr. W. Caselmann danke ich für seine stete Unterstützungsbereitschaft und die fachliche Durchsicht der Arbeit.

Herrn Dr. E.-A. Auerswald danke ich für zahlreiche Gespräche und die damit verbundenen fachkundigen Ratschläge.

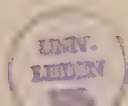
Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. P. H. Hofschneider, der den Fortgang der Arbeit stets mit Interesse verfolgt und gefördert hat.

Inhaltsverzeichnis

A	Zusammenfassung.....	1
B	Einleitung.....	4
B 1	Proteolytische Enzyme und Prozesse.....	4
B 1.1	Proteinaseinhibitoren.....	5
B 1.2	Serinproteinasen.....	8
B 1.3	Inter-alpha-Trypsininhibitor.....	8
B 1.3.1	Eigenschaften, Isolierung, Syntheseort.....	8
B 1.3.2	Struktur.....	10
B 1.3.2.1	HI-30 (Human Inhibitor MG 30 kD).....	10
B 1.3.2.2	N-terminale Aminosäuresequenzen von ITI und ITI-Derivaten.....	11
B 1.3.2.3	Schwere und leichte Ketten des ITI.....	12
B 1.3.3	Physiologische Funktion von ITI und ITI-Deriva- ten.....	15
B 2	Chromosomale Genstrukturen.....	16
B 2.1	α_1 -Anitrypsin, α_1 -Antichymotrypsin, Ovalbu- min.....	17
B 2.2	Boviner pankreatischer Trypsininhibitor.....	19
B 2.3	Pankreatischer sekretorischer Trypsininhibitor.....	20
B 3	Problemstellung.....	21
C	Ergebnisse.....	22
C 1	Nachweis und Identifizierung von ITI H-Ketten spezifischen Sequenzen im Genom durch Hybridi- sierung mit der pit1 cDNA.....	22
C 1.1	Präparation der pit1 cDNA Sonde.....	23
C 1.2	Southernanalyse von genomischer DNA mit der pit1 cDNA.....	24
C 1.3	Klonierung	30
C 1.3.1	Anlegen einer Genbank im Lambda Phagen EMBL4	30
C 1.3.2	Screenen der EMBL4 Genbank mit der pit1 Sonde.	39
C 1.3.3	Charakterisierung der pit1 Phagenklone A1-A5..	41
C 1.3.3.1	Restriktionsanalyse von A1-A5.....	41
C 1.3.3.2	Hybridisierung von A1-A5 mit endständigen Fragmenten der pit1 cDNA.....	43
C 1.3.4	Zwischenzusammenfassung.....	47
C 2	Untersuchung der pit1 Phagenklone auf homologe DNA Bereiche.....	48
C 2.1	Überlappende DNA Bereiche von A1-A5 (H-Kette).	48

C 2.1.1	Vergleich der Ergebnisse der Restriktionskarten von A1-A5 mit den Ergebnissen der Hybridisierung mit endständigen Fragmenten der piti cDNA in C 1.3.3.2.....	58
C 2.1.2	Vergleich der Restriktionskartierungsdaten von A1-A5 mit den Ergebnissen der Southernanalyse von genomischer DNA mit der piti cDNA Sonde in C 1.2.....	59
C 2.2	Zwischenzusammenfassung.....	60
C 3	Voruntersuchungen mit der L-Ketten cDNA Sonde (miciti).....	61
C 3.1	Präparation der miciti cDNA Sonde.....	62
C 3.2	Untersuchung der H-Ketten cDNA (piti) auf homologe DNA Bereiche mit der L-Ketten cDNA (miciti).....	62
C 3.3	Untersuchung der Phagenklone A1-A5 auf homologe DNA Bereiche mit der miciti cDNA.....	62
C 4	Nachweis und Identifizierung von ITI L-Ketten spezifischen Sequenzen im Genom durch Hybridisierung mit der miciti cDNA.....	63
C 4.1	Southernanalyse von genomischer DNA mit der miciti cDNA.....	63
C 4.2	Klonierung.....	68
C 4.2.1	Anlegen einer Genbank im Lambda Phagen EMBL3..	69
C 4.2.2	Screenen der EMBL3 Genbank mit der miciti cDNA Sonde.....	72
C 4.2.3	Charakterisierung der miciti Phagenklone B1-B8	74
C 4.2.3.1	Restriktionsanalyse von B1-B8.....	74
C 4.2.3.2	Hybridisierung von B1-B8 mit endständigen Fragmenten der miciti cDNA.....	76
C 4.2.4	Zwischenzusammenfassung.....	78
C 5	Untersuchung der miciti Phagenklone auf homologe DNA Bereiche.....	80
C 5.1	Untersuchung von B1-B8 auf homologe DNA Bereiche mit der H-Ketten cDNA (piti).....	80
C 5.2	Überlappende DNA Bereiche von B1-B8 (L-Kette).	81
C 5.2.1	Vergleich der Ergebnisse der Restriktionskartierung von B1-B8 mit den Ergebnissen der Hybridisierung mit endständigen Fragmenten der miciti cDNA in C 4.2.3.2.....	92
C 5.2.2	Vergleich der Restriktionskartierungsdaten von B1-B8 mit den Ergebnissen der Southernanalyse mit der miciti Sonde in C 4.1.....	93
C 5.3	Zwischenzusammenfassung.....	93

D	Diskussion.....	94
D 1	Sequenzverwandtschaft von L- und H-Kette.....	94
D 2	Intaktheit des für die L-Kette kodierenden Gens.....	95
D 3	Unterschiedliche Genlängen der L-Kette.....	95
D 4	Intaktheit des für die H-Kette kodierenden Gens.....	99
D 5	Genomische Organisation der ITI Gene.....	101
D 6	Ausblick.....	104
E	Material und Methoden.....	105
E 1	Material.....	105
E 1.1	Bakterienstämme	105
E 1.2	Bakteriophagen.....	106
E 1.3	Plasmide.....	106
E 1.4	DNA.....	106
E 1.5	Chemikalien.....	107
E 1.6	Antibiotika.....	108
E 1.7	Restriktionsendonukleasen.....	108
E 1.8	Sonstige Enzyme.....	108
E 1.9	Radiochemikalien.....	108
E 1.10	Sonstiges Material.....	108
E 1.11	Medien und Puffer.....	109
E 1.12	Geräte.....	110
E 2	Methoden.....	112
E 2.1	DNA-Isolierungen.....	112
E 2.1.1	Isolierung hochmolekularer DNA.....	112
E 2.1.2	Präparative Isolierung und Schnellpräparation von Lambda DNA.....	113
E 2.1.3	Präparative Isolierung und Schnellpräparation von Plasmid DNA.....	115
E 2.2	Bestimmung der optischen Dichte.....	116
E 2.3	Verdauung mit Restriktionsendonukleasen.....	117
E 2.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	118
E 2.5	Isolierung von DNA Fragmenten.....	118
E 2.5.1	Elektroelution.....	118
E 2.5.2	Isolierung von DNA Fragmenten mit DE 81 Papier.....	119
E 2.6	Transfer von DNA auf Nitrocellulosefilter.....	120
E 2.6.1	Southernblot, Sandwichblot.....	120
E 2.6.2	Plaqueblot.....	121
E 2.7	Hybridisierung.....	121
E 2.7.1	Radioaktive Markierung von DNA durch Nick- Translation.....	121
E 2.7.2	Hybridisierung von DNA mit DNA.....	122



E 2.8	Herstellung von Bakterienkulturen.....	123
E 2.9	Dauerkulturen in Glyzerin.....	123
E 2.10	Herstellung kompetenter E. coli Zellen.....	123
E 2.11	Transformation.....	124
E 2.12	Klonierung in Lambda Phagen.....	124
E 2.12.1	Herstellung der Vektorarme.....	124
E 2.12.2	Partialverdau von genomischer DNA mit verschiedenen Enzymkonzentrationen.....	125
E 2.12.3	Größenfraktionierung der mit MboI partial verdauten chromosomalen DNA durch Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation.....	125
E 2.12.4	5'-Dephosphorylierung.....	126
E 2.12.5	Ligierung und Herstellung rekombinanter Phagen DNA.....	126
E 2.12.6	Herstellung von Verpackungsextrakten.....	127
E 2.12.6.1	Aufbrechen der E. coli Zellen durch Ultraschall.....	128
E 2.12.6.2	Aufbrechen der E. coli Zellen durch Frieren und Tauen.....	129
E 2.12.7	In vitro Verpackung und Ausplattieren der rekombinanten Phagen.....	129
E 2.13	Phagenstammkulturen.....	130
	Literatur.....	131

Abkürzungsverzeichnis

A Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Aufklärung der genomischen Struktur des Inter-alpha-trypsininhibitors durchgeführt. Eine Feinanalyse der Genstruktur läßt sich dabei nur an klonierten DNA-Fragmenten durchführen. Für diese Aufgabe wurde humane Leukozyten DNA in EMBL3 und EMBL4-Phagenvektoren kloniert. Durch Substitution am Phagengenom wurden Insertionen von durchschnittlich 12-23 kb eingebaut. Für die Fragmentierung der Leukozyten DNA wurde die Methode der Partialverdauung mit der Tetranuklease (MboI) gewählt, deren Spaltstellen statistisch alle 256 bp auf dem humanem Genom verteilt vorkommen. Die kohäsiven Enden der MboI verdauten humanen Leukozyten DNA, die mit denen der BamHI (Hexanuklease) verdauten Lambdavektor DNA kompatibel sind, können direkt kloniert werden. Nach in vitro Verpackung wurden Wirtsbakterien mit Phagenpartikel transduziert und infektiöse rekombinante Phagen isoliert. Nach Etablierung und Optimierung der experimentellen Versuchsbedingungen genügten 1.0 ug (EMBL4 Genbank) und 0.7 ug (EMBL3 Genbank) Leukozyten DNA, um eine komplette Genbank (8×10^5 Alu-positive rekombinante Phagen) zu erstellen, die die Isolierung eines 'single copy' Gens mit 99% Wahrscheinlichkeit gewährleistet (Clark & Carbon, 1976). Die genetische Selektion der chimären Phagen erfolgte über das red/gam-System. Es wurden zwei partielle cDNA Sonden zur Verfügung gestellt, die unterschiedliche 3' Enden besaßen. Eine der beiden Sonden kodiert für die L-Kette des Inter- α -Trypsininhibitors (Kaumeyer et al., 1986) und besitzt eine Länge von 952 bp. Die zweite Sonde kodiert für eine der beiden bisher sequenzierten H-Ketten (Schreitmüller et al., 1987) und besitzt eine Länge von 2260 bp. Die Sonden wurden von Plasmid Fremd-DNA gereinigt, um etwaige Kreuzreaktionen mit anderen Plasmid- oder Phagensequenzen bei der Southernanalyse und Hybridisierung zu vermeiden. Es wurden jeweils 8×10^5 Alu positive rekombinante Phagen durch Plaquehybridisierung untersucht.

Mit einer H-Ketten Sonde (piti) wurden 5 positive, für die schwere Kette des ITI spezifische Plaques isoliert und bis zur Klonalität gereinigt (A1-A5). Durch Spaltung

mit der Restriktionsendonuklease EcoRI, deren Spaltstelle im Polylinker des Phagen EMBL4 sitzt, wurde die Größe der Insertionen (A1: 5, 3.6, 2.9, 2.1, 1.6, 0.96, 0.78; A2: 9.0, 3.0; A3: 11.5, 1.8; A4: 15; A5: 13; 1.2) bestimmt. Southernblotting und Hybridisierung der gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA bestätigte die Homologie der Insertionen zu den cDNA Sequenzen mit jeweils einer einzigen hybridisierenden Bande pro Klon. Durch Restriktionsanalyse mit den Enzymen BamHI, EcoRI, HindIII und XbaI gelang es, den Klonen A1-A5 gemeinsame typische Spaltmuster zu bestimmen und durch deren Zuordnung die den einzelnen Klonen gemeinsamen homologen DNA Bereiche zu erkennen. Durch zusätzliche Hybridisierungsexperimente konnte der zur H-Ketten cDNA Sonde positive Bereich bestimmt und von den übrigen flankierenden genomischen Sequenzen abgegrenzt werden. Die vergleichende Gegenüberstellung der Ergebnisse der Southernanalyse von menschlicher Leukozyten DNA und die der Restriktionskartierung und Hybridisierung von klonierter genomischer DNA mit der H-Ketten Sonde lassen erkennen, daß alle klonierten Fragmente von A1-A5 Bereiche umfassen, die Teile eines gemeinsamen Gens darstellen.

Die Plaquehybridisierung mit einer L-Ketten Sonde (miciti) ließ 8 positive für die Leichte Kette des ITI kodierende Klone erkennen (B1-B8). Durch Spaltung der Phagen DNA mit der Restriktionsendonuklease SalI konnten die klonierten Insertfragmente von B1-B8 komplett herausgeschnitten werden (B1: 16.9; B2: 18.5; B3: 16.1; B4: 23.6; B5: 12.9 B6: 15.7; B7: 13.0; B8: 18.5). Southernblotting und Hybridisierung der mit den Restriktionsenzymen kartierten Phagen DNA ließ erkennen, daß alle Klone zur cDNA homologe hybridisierende Fragmente besitzen. Durch Restriktionsanalyse mit den Enzymen BamHI, EcoRI und SalI konnten, wie analog bei den Klonen A1-A5, den Klonen B1-B8 gemeinsame Spaltstellen zugeordnet werden. Durch Southernblotting und Hybridisierung wurde der zur L-Ketten Sonde homologe Bereich bestimmt. Eine Gegenüberstellung der Restriktions- und Hybridisierungsergebnisse mit der L-Ketten Sonde läßt erkennen, daß verschiedene Genformen (Retropseudogene) der L-Kette im menschlichen Genom vorkommen, die sich in ihrer Länge am 5'-Ende unterscheiden. Es existieren entweder, wie in Abb. 29 dargestellt, sechs verschiedene Genformen, wobei es sich

bei B1 und B3 bzw. B5 und B6 um identische Formen handelt, oder aber es gibt nur drei unterschiedlich lange Genformen der L-Kette (B1 (bzw.B3), B4, B5), was bedeutet, daß alle übrigen ITI spezifischen Klone (B2, B6, B7, B8) infolge der Klonierung als Fragmente der längeren Genformen entstanden sind (Abb. 30). Prozessierte Gene wurden bei den bisher charakterisierten menschlichen Plasma-Proteinaseinhibitoren nicht beschrieben.

1 Proteolytische Enzyme und Prozesse

Proteolytische Enzyme ('Proteasen') findet man in allen lebenden Organismen. Bei niederen Lebewesen sind sie an relativ einfachen Aufgaben wie Abbau und Umsatz von zell- und körpereigenen Proteinen beteiligt. Im Laufe der evolutionären Entwicklung haben sich diese 'einfachen' Proteasen, die ursprünglich ausschließlich Verdauungsfunktionen besaßen, an spezifischere und komplexere Aufgaben physiologischer Regulationsprozesse bei höheren Organismen angepaßt. Sie erreichten ein hohes Maß an Spezialisierung, indem sie sich in ihrer Aktivität an eine ausgewählte Anzahl von Peptidbindungen in den jeweiligen Proteinsubstraten beschränkten, die sich an spezifischen Stellen in den Substraten befinden. Durch die limitierte Proteolyse wird das Proteinsubstrat nicht zerstört, jedoch seine Eigenschaften und physiologische Rolle modifiziert. Viele biologischen Prozesse in höheren Organismen werden durch diesen Typ der Proteasereaktion reguliert, wie z.B. die Freisetzung von Hormonen aus inaktiven Vorläufermolekülen z. B. Insulin aus Proinsulin, die Prozessierung sekretorischer Proteine während der Membrantranslokation, die Zusammensetzung makromolekularer Strukturen wie Kollagenfasern oder bestimmte Viren sowie die Kontrolle der proteolytischen Verdauung selbst (Neurath, 1984).

Proteolytische Enzyme stellen nicht nur eine physiologische Notwendigkeit, sondern auch ein potentiellles Risiko dar. Wenn sie nicht kontrolliert werden, können sie Proteinkomponenten von Zellen und Geweben zerstören. Die Bedeutung dieses Risikos wird durch die Tatsache verdeutlicht, daß Proteinaseinhibitoren 10% des gesamten Plasmaeiweißes darstellen (Powers and Harpers, 1986). Proteolytische Prozesse werden allgemein durch zwei Kontrollmechanismen gesteuert: Die Aktivierung inaktiver Proteasevorläufer (Zymogene) erfolgt durch limitierte Proteolyse (Neurath, 1964). 2. Die Aktivität proteolytischer Enzyme wird durch Komplexbildung mit Proteininhibitoren inhibiert (Laskowski & Kato, 1980). Die physiologische Bedeutung beider Mechanismen wird bei bestimmten Krankheitszuständen aufgezeigt, in denen ein Mangel funktioneller Enzyme oder Proteinaseinhibitoren vorliegt. Beispiels-

weise beruhen einige Arten familiärer Hämophilien auf der Defizienz einer bestimmten Plasmaprotease, die normalerweise Zymogene in der Blutgerinnungskaskade aktiviert. In einem anderen Fall, dem familiärem Emphysem, verhindert eine genetische Mutation im α_1 -Proteinaseinhibitor seine Sekretion von der Leber, was eine abnormal niedrige Plasmakonzentration zur Folge hat und infolgedessen zu einem Abbau des Bindegewebes der pulmonaren Alveolen durch Leukozytenelastase führt.

1.1 Proteinaseinhibitoren

Protein-Proteinaseinhibitoren kommen sowohl in tierischen Geweben als auch bei Pflanzen und Mikroorganismen vor. Ihre physiologische Bedeutung besteht im Schutz des Organismus vor ungewollter Proteolyse. Mit Ausnahme der α_2 -Makroglobuline können Protein-Proteinaseinhibitoren nach ihren Zielenzymen in vier Klassen eingeteilt werden: die Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metallo-Proteinase-Inhibitoren. Die Inhibitoren agieren bis auf wenige Ausnahmen streng klassenspezifisch (Laskowsky & Seabock, 1971; Laskowsky & Kato, 1980).

Die bisher am besten charakterisierte Klasse ist die der Serin-Proteinaseinhibitoren. Sie können in mindestens 13 Familien unterteilt werden (Laskowski, 1986). Innerhalb jeder Familie (Ausnahme Potato II- und Ascaris-Trypsin-Inhibitorfamilie) kann die Lage des reaktiven Zentrums sowie die Anordnung der Disulfidbrücken aufgrund von Homologien abgeleitet werden. Die Serin-Proteinaseinhibitoren stellen streng kompetitiv agierende Inhibitoren dar, die mit ihren Zielenzymen äquimolare Komplexe bilden und dabei in substratähnlicher Weise reagieren (Laskowski & Kato, 1980). Die Spezifität für das Zielenzym wird normalerweise durch die Aminosäure, die sich im reaktiven Zentrum des Inhibitors in der Position P_1 befindet, festgelegt. Etwa 10-15 Aminosäuren um das reaktive Zentrum des Inhibitors haben mit dem Zielenzym aber Kontakt (Laskowski, 1986). Die Art dieser Aminosäuren (Abb. 1) beeinflusst die Stärke und die Spezifität der Wechselwirkung zwischen Enzym und Inhibitor. In den Komplexen selbst ist jegliche katalytische Aktivität des Enzyms blockiert.

Nr.	Hühnchen	andere Vogelarten
6	Val	Ile
7	Asp	Asn
8	Cys	
9	Ser	
10	Glu	Asp Gly
11	Tyr	His
12	Pro	
13	Lys	Arg Thr Met Gln
14	Pro	His
15	Ala	Val Asp Ser Gly Glu Thr
16	Cys	
17	Thr	Pro Ser Arg Leu Met
18	Leu	Pro Met Val Gln Ser Ala Thr Lys
19	Glu	Asp Leu
20	Tyr	Phe Asn Asp Leu Gln Glu His Arg
21	Arg	Met Phe Lys Val Thr Leu
22	Pro	
23	Leu	Val Ile Phe
24	Cys	
25	Gly	
26	Ser	
27	Asp	Asn
28	Asn	Ser
29	Lys	Gln Ile Glu
30	Thr	Ser Ile
31	Tyr	
32	Gly	Ser Asn Ala Asp Val Arg His
33	Asn	Ser Asp
34	Lys	Arg
35	Cys	
36	Asn	Asp Ala Ser Gly Tyr
37	Phe	
38	Cys	
39	Asn	Ser
40	Ala	
41	Val	Ala Phe
42	Val	Ala Leu Met
43	Glu	Asp Gln Lys His
44	Ser	Lys
45	Asn	Ser
46	Gly	Val
47	Thr	-
48	Leu	-
49	Thr	Ile Asn Ser
50	Leu	Val Phe
51	Ser	Arg Gly Asn
52	His	Arg
53	Phe	Leu Ile
54	Gly	Gly
55	Lys	Glu Thr Gln
56	Cys	

Abb. 1. Die Aminosäuresequenzen der dritten Domäne des Ovomucoidinhibitors und alternative Aminosäuren von 100 anderen Vogelarten.

Zahlen in Spalte: Numerierung dritte Domäne des Ovomucoidinhibitors
 Fettgedruckte Aminosäuren: in der Kontaktregion mit Streptomyces griseus Proteinase B (Kato et al., 1986).

Zwei Aspekte sind aus der Sicht der Evolution von besonderer Bedeutung (Laskowski, 1986):

1. Die Substitution der Aminosäure in P₁-Position des reaktiven Zentrums durch eine andere Aminosäure. Die daraus resultierende Variabilität hat zumeist einen Wechsel der inhibitorischen Spezifität zur Folge. Die Veränderung von Aminosäuren im reaktiven Zentrum des Inhibitors während der Evolution steht in Kontrast zur Evolution anderer Proteine, bei denen die Struktur aktiver Zentren zumeist konserviert ist und Substitutionen deshalb zu einem Verlust der biologischen Aktivität führen.

2. Die Genelongation infolge Duplikation (z.B. beim Ovoidinhibitor des Hühnchenplasmas und -eiweißes, der sechs strukturhomologe Domänen hat) oder Genfusion (Beispiel: Chelonianin aus Seeschildkröte, mit zwei strukturverschiedenen Domänen). Dadurch können Inhibitoren mehrere reaktive Zentren auf derselben Polypeptidkette "erwerben". Disulfidbrücken stabilisieren die tandemartig angeordneten Domänen, die selbst wiederum durch kurze Peptide verknüpft sind. Die Domänen können dabei unterschiedlichen Inhibitortypen angehören wie beim Chelonianin (Laskowski & Kato, 1980).

Die Plasma-Proteinaseinhibitoren stellen nach den Albuminen und Immunglobulinen die drittgrößte Gruppe funktioneller Proteine im menschlichen Plasma dar. Proteinaseinhibitoraktivität in menschlichem Plasma wurde zuerst von Fermi & Pernossi (1897) im Jahre 1894 beobachtet. Die Inhibitoren kontrollieren eine Vielzahl biologischer Prozesse, die durch spezifische Proteinasen gesteuert werden. α_1 -Proteinaseinhibitor (α_1 PI), Antithrombin III (AT III), α_1 -Antichymotrypsin (α_1 Achy), C1-Inhibitor (C1-Inh) sowie α_2 -Antiplasmin (α_2 AP) aus menschlichem Plasma werden aufgrund gemeinsamer Eigenschaften bezüglich ihrer Hemmechanismen zur sog. Serpin-Klasse zusammengefaßt (Travis & Salvesen, 1983). Die Serpine und der damit nicht verwandte Inter-alpha-Trypsininhibitor (ITI) hemmen spezifisch Serinproteinasen.

1.2 Serinproteinasen

Die Serinproteinasen stellen die umfangreichste Gruppe proteolytischer Enzyme dar. Sie spielen eine Rolle in physiologischen Prozessen wie Verdauung (Neurath, 1984), Blutkoagulation (Davie et al., 1979), Fibrinolyse (Wiman and Collen, 1978), Komplementaktivierung (Reid and Porter, 1981) sowie der Freilassung physiologisch aktiver Peptide (Neurath, 1984). Viele dieser essentiellen Prozesse werden durch die Spaltung einer einzigen oder weniger Peptidbindungen in Precursorproteinen initiiert. Unter physiologischen Bedingungen ist die Spaltung der Peptidbindung irreversibel. Bei Blutgerinnung, Fibrinolyse und Komplementaktivierung laufen Kaskaden aufeinanderfolgender limitierter proteolytischer Reaktionen ab. Das erste Signal kann nicht nur kontrolliert, sondern durch die Kaskaden auch amplifiziert werden. In ähnlicher Weise kann kontrollierte Proteolyse abgeschaltet oder können Proteine und Peptide durch Spaltung von einzelnen Bindungen inaktiviert werden.

Unkontrollierte Proteolyse durch Serinproteinasen spielt z. B. eine wichtige Rolle bei Krankheiten wie pulmonares Emphysem (B 1), adult respiratory distress Syndrom (ARDS) und Pankreatitis.

1.3 Inter-alpha-Trypsininhibitor (ITI)

1.1.3 Eigenschaften, Isolierung, Syntheseort

ITI wurde 1961 von Steinbuch und Loeb als Plasmaprotein isoliert und als Protein γ bezeichnet. Heimbürger und Schwick (1962) zeigten später, daß dieses Protein in der Elektrophorese in der inter-alpha-Region zwischen den α_1 - und α_2 -Globulinen wandert und inhibitorische Aktivität gegenüber Trypsin besitzt (daher der Name: Inter-alpha-Trypsininhibitor).

Der ITI kommt im menschlichen Serum und Plasma in einer Konzentration von 500 mg/l vor (Heimbürger et al., 1971). Er ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 180 kD (Steinbuch, 1976), neuere Literaturangaben liegen bei 240 kD (Schreitmüller et al., 1987). Un-

tersuchungen zur Charakterisierung des säurelabilen Inhibitors erwiesen sich zunächst als schwierig, da viele Reinigungsverfahren eine Fragmentierung des Proteins zur Folge hatten (Steinbuch, 1976). Die Fragmente zeigten dabei immunologische Identität. 1981 konnten einheitliche ITI Präparationen zum ersten Mal von Salier et al. durch Immunoaffinitätschromatographie erhalten werden, die biochemische Analysen erlaubten.

Der Kohlenhydratgehalt des ITI beträgt 8.4% (Heimbürger et al., 1971). In einigen Präparationen wurden unterschiedliche Mengen an Zink gefunden. ITI ist damit möglicherweise ein Metalloprotein mit 1g-Atom Zink/ Molekül (Steinbuch, 1976). Die Behandlung mit EDTA hat allerdings keinen Einfluß auf die trypsininhibitorische Aktivität (Steinbuch & Loeb, 1961; Steinbuch et al., 1966).

Die gewöhnlich während der Isolierung von ITI beobachteten Fragmentierungen wurden von Hochstrasser et al., 1976a; Dietl et al., 1979; Pejaudier et al., 1983 durch Behandlung mit verschiedenen Proteinasen nachgeahmt. Die entstandenen inhibitorischen Fragmente mit einem apparenten Molekulargewicht von 65 kD und 22 kD (Gelchromatographie) waren aktiv. Man nahm an, daß das kleinere Fragment aus dem erstgenannten entstand. Dieselben Fragmente konnten auch nach Gelchromatographie pathologischer Sera oder säurebehandelter Sera (Hochstrasser et al., 1976) nachgewiesen werden. In Kontrollseren wurden ebenfalls von Salier et al., (1983a) mehrere ITI verwandte Proteine niedrigeren Molekulargewichtes immunologisch nachgewiesen. Diese umfassen etwa 20% des gesamten immunreaktiven ITI. Ihre Gegenwart in gesammelten und aufbewahrten Serumproben beweist jedoch nicht, daß sie auch in vivo im Plasma existieren.

ITI wird in der Leber synthetisiert (Bourguignon et al., 1983; Salier et al., 1987). Er hemmt neben Rindertrypsin und -chymotrypsin (Heimbürger et al., 1971), menschliches Akrosin (Fitz et al., 1972), menschliches Trypsin und Chymotrypsin sowie Elastase aus polymorphkernigen Granulozyten (Jochum & Bittner, 1983; Albrecht et al., 1983b) und menschliches Kathepsin G (Morii & Travis, 1985).

1.3.2 Struktur

1.3.2.1 HI-30 (Human Inhibitor MG 30 kD)

Postuliert wird, daß durch limitierte Proteolyse in vivo aus dem säurelabilen ITI ein niedermolekulares, säurestabiles Fragment (HI-30) freigesetzt wird, das mit ITI immunologisch kreuzreagiert und volle inhibitorische Aktivität besitzt (Hochstrasser et al., 1976). Das Molekulargewicht dieses Inhibitors wurde in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zu 44 kD (Hochstrasser et al., 1984) bestimmt, beträgt aber nach neueren Literaturangaben 56 kD (Gebhard et al., 1988). Am N-Terminus von HI-30 befindet sich ein Extensionspeptid mit 21 Aminosäuren (Wachter et al., 1981). Die Molekularmasse der gesamten Polypeptidkette von 143 Aminosäuren ergibt 15.34 kD (Wachter und Hochstrasser, 1981).

Durch Langzeitinkubation mit Trypsin in vitro wird das HI-30 Fragment in das Extensionspeptid (Glykopeptid) und ein 14 kD Fragment zerlegt (Wachter und Hochstrasser, 1979, Abb. 2).

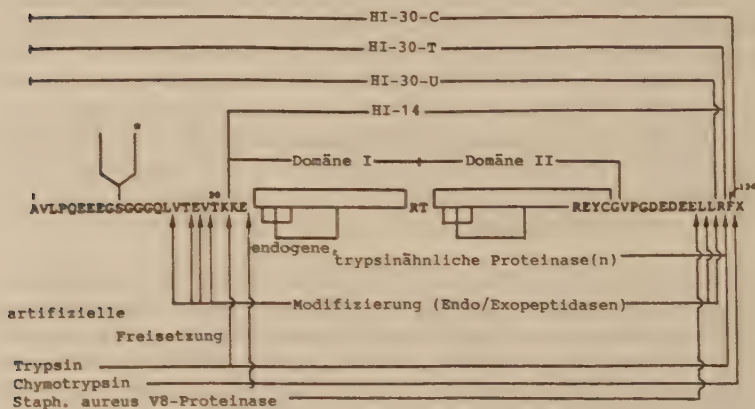


Abb. 2. Physiologische und artifizielle Freisetzung sowie physiologisches Prozessing von HI-30.
(nach Reisinger et al., 1985)

Letzteres beinhaltet noch die gesamte antiproteolytische Aktivität. Es existiert jedoch nicht in vivo. Das Glykopeptid am N-Terminus von HI-30 besitzt eine über Serin O-glykosidisch angeknüpfte Kohlenhydratkette mit viel Galaktosamin- und Galaktoseresten (Hochstrasser et al., 1981a und b). Das HI-14 Fragment besitzt zwei tandemartig angeordnete inhibitorische Domänen vom Kunitz-Typ (Wachter et al., 1979; Reisinger et al., 1985). Methionin in P₁-Position im reaktiven Zentrum der N-terminalen Domäne des nativen Inhibitors bestimmt die Spezifität für Elastase, Arginin in P₁-Position der zweiten Domäne (C-terminal) bestimmt die Spezifität für Trypsin und Plasmin. Die Polypeptidkette beider Domänen umfaßt 122 Aminosäuren sowie ein Glucosamin enthaltendes Oligosaccharid, welches N-glykosidisch über ein Asparagin an Position 24 der ersten N-terminalen Domäne von HI-30 angeknüpft ist (Hochstrasser et al., 1981).

Das Molekulargewicht von HI-30 nach Deglykosylierung beträgt 28 kD.

1.3.2.2 N-terminale Aminosäuresequenzen von ITI und ITI-Derivaten

Im Gegensatz zu ursprünglichen Annahmen (Wachter & Hochstrasser, 1979; 1981) wurde später beschrieben, daß die inhibitorische Aktivität ausschließlich im N-terminalen Teil des Moleküles lokalisiert ist (Morii & Travis, 1985). Die N-terminalen Aminosäuresequenzen von nativen ITI (Morii & Travis, 1985; Reisinger et al., 1985) erwiesen sich als identisch mit den Sequenzen eines im menschlichen Harn vorkommenden glykosylierten Trypsininhibitors, der als UTI (urinärer Trypsininhibitor) bezeichnet wird (Wachter et al., 1979; Wachter & Hochstrasser, 1981; Hochstrasser & Wachter, 1979), sowie mit denen eines niedermolekularen Inhibitors aus der Bronchialschleimhaut (Hochstrasser et al., 1973 a,b).

Die Aminosäuresequenzen sind darüber hinaus identisch mit den N-terminalen Sequenzen des einzigen inhibitorisch aktiven Fragmentes aus nativem ITI, das nach Spaltung mit Serratia marcescens Metalloproteinasen erhalten wurde (Morii & Travis, 1985), sowie mit dem aus Serum isolier-

tem und den nach Spaltung mit Trypsin bzw. Chymotrypsin erhaltenen HI-30 Fragmenten (Reisinger et al., 1985 Abb. 2).

Da alle diese Moleküle durch proteolytische Prozessierung aus ein und demselben Vorläufermolekül entstehen sollen, hat man den ITI lange Zeit für ein einkettiges Molekül gehalten (Reisinger et al., 1985; Maruyama, M. et al., 1986). Diese Annahme ist dadurch erhärtet, daß auch in der SDS/PAGE selbst in Gegenwart stark denaturierender und reduzierender Agenzien (SDS, β -Met) nur eine einzige Bande (MG 180 kD) nachzuweisen ist. Da der säurelabile ITI darüberhinaus im Serum zusammen mit anderen säurestabilen, antigenisch verwandten und inhibitorisch aktiven Molekülen niedrigeren Molekulargewichtes vorkommt, die sowohl im Urin als auch in der Bronchialschleimhaut gefunden wurden (Proksch and Routh, 1972; Hochstrasser (1980); Hochstrasser et al., 1984), charakterisierte man den ITI lange Zeit als ein Vorläufermolekül (Proinhibitor) oder eine intravaskuläre Depotform (Gebhard and Hochstrasser, 1986), aus der die kleineren, inhibitorisch aktiven Derivate dann erst nach Proteolyse induzierter Freisetzung zu ihrem Wirkungsort gelangen.

Neueste Forschungsergebnisse liefern nun Hinweise dafür, daß ITI aus schweren (H) und leichten (L) Polypeptidketten aufgebaut ist.

1.3.3.3 Schwere und leichte Ketten des ITI

Bourguignon et al. (1983) fanden nach zellfreier Translation von Pavianleber-mRNA und anschließender Immunpräzipitation mit Inter- α -Trypsininhibitor-Antiserum zwei Polypeptide mit Molekulargewichten von 95 kD und 40 kD. Das kleinere Peptid besaß eine höhere Syntheserate. Nach Größenselektion der mRNA und anschließender Immunpräzipitation mit Inter- α -Trypsininhibitor-Antiserum im zellfreien System identifizierten dieselben Autoren zwei verschiedene mRNA-Populationen, die für die beiden unterschiedlichen Polypeptide kodieren. Immunologische Studien zeigten, daß das größere Polypeptid im ITI, aber nicht im UTI, das kleinere jedoch in beiden vorhanden ist. ITI sollte demnach aus einer schweren Kette (95 kD) und zwei

leichten Ketten (a 40 kD) aufgebaut sein, wobei nur die L-Polypeptidkette inhibitorisch aktiv ist. Sie ist Bestandteil der kleineren säurestabilen Derivate.

Der Befund des unglykosylierten 40 kD Polypeptids (Bourguignon et al., 1983) steht nicht in Einklang mit dem berechneten Molekulargewicht von 15.34 kD für den reinen Polypeptidanteil des Harntrypsininhibitors (Wachter & Hochstrasser, 1981). Das 40 kD Fragment könnte möglicherweise einen Vorläufer darstellen, der aus zwei UTI-Untereinheiten zusammengesetzt ist. Wahrscheinlicher ist, daß das bisher als UTI bezeichnete Protein (Molekularmasse glykosyliert und hydratisiert: 44 kD in SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) beim Abbau des primären unglykosylierten 40 kD Translationsproduktes entsteht.

Kaumeyer et al. (1986) konnte zeigen, daß die zum HI-30 Fragment komplementäre mRNA von 1.2 kb (Leichte Kette) zusätzlich für eine bisher nicht mit ITI assoziierte α_1 -Mikroglobulin-Sequenz (α_1 -m), ein Akutphasenprotein (Mendez et al., 1986), kodiert. Die α_1 -Mikroglobulinsequenz befindet sich im Anschluß an eine Signalsequenz vor dem N-Terminus des HI-30 Fragmentes.

Die für die inhibitorischen Domänen des ITI kodierende cDNA wurde von verschiedenen Autoren durch unterschiedliches experimentelles Vorgehen isoliert (Bouguignon et al., 1985; Kaumeyer et al., 1986; Schreitmüller et al., 1987). Durch partielle Bestimmung von aus Serum isoliertem ITI konnten große Teile der von der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenzen bestätigt werden (Salier et al. 1987; Schreitmüller et al., 1987). Die α_1 -Mikroglobulinsequenz ist nicht Bestandteil von aus Serum isoliertem ITI (Salier et al., 1987). Sie wird vermutlich vor dem Zusammenfügen der Proteinkomponenten durch eine bisher nicht identifizierte Protease abgespalten. Dies wird durch folgende Experimente belegt:

(1) Die Aminosäuresequenzanalyse von aus humanem Serum isoliertem ITI ließ keine α_1 -Mikroglobulinsequenzen erkennen (Salier et al., 1987; Jessen et al., 1988).

(2) Die N-terminalen Sequenzen des menschlichen ITI aus Serum sind identisch mit denen des UTI, der C-terminalen Komponente des α_1 m-UTI (Salier et al. 1987; Schreitmüller et al., 1987).

(3) Nativer ITI kann durch Antikörper, die gegen α_1 -Mikroglobulin gerichtet sind, nicht präzipitiert werden (Salier et al., 1987).

Die Bedeutung der α_1 -Mikroglobulinsequenz als Bestandteil für die α_1 m-UTI kodierende mRNA ist nicht klar. α_1 m wird ebenso wie die H- und die L-Kette in Leberzellen synthetisiert (Tejler et al., 1976; Akerström et al., 1985). Das bedeutet, daß ITI-Derivate, die in Bronchial- und Harnwegen gefunden wurden, nicht in Lungen- und Nierengewebe synthetisiert werden, obwohl andere Autoren wiederum die mRNA für α_1 m in der Rattenniere gefunden haben (Kastern et al., 1986). Die mRNA für die L-Kette wurde nicht in einer endothelialen Zelllinie gefunden, obwohl für HI-30 eine potentielle Rolle als Endothelzellenwachstumsfaktor angesehen wird (McKeehan et al., 1986). Diese Beobachtung läßt die Annahme zu, daß ein Rezeptor für das HI-30 Molekül auf der Endothelzelle existiert. Bisher wurde über keine weiteren ITI spezifischen Sequenzen berichtet, die inhibitorische Domänen enthalten.

Salier et al. (1988) lieferten zusätzliche Hinweise für das Vorhandensein von schweren Ketten. Sie fanden durch Analyse von Poly A⁺ mRNA, die durch eine cDNA hybridselektiert und deren Expressionsprodukt durch Immunpräzipitation mittels H-Ketten spezifischen Antiserum identifiziert worden war, ein Polypeptid von 91 kD, dessen Sequenz mit der von Schreitmüller et al. (1987) publizierten identisch ist. Die Northern Blot Analyse mit derselben cDNA Sonde detektierte eine dazugehörige einheitliche Population von mRNAs.

Durch Screenen einer humanen Leber-cDNA-Expressionsbibliothek mit ITI spezifischen Antiserum gelang es Schreitmüller et al. (1987) drei cDNA Klone zu identifizieren, deren Sequenzen für drei unterschiedliche Polypeptide des ITI kodieren. Zwei Sequenzen (schwere H-Ketten) sind entfernt verwandt zueinander. Sie weisen jedoch keine zum HI-30 Fragment (leichte L-Kette) homologen Bereiche auf.

Diesen Ergebnissen steht weiterhin das Verhalten von ITI in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gegenüber, in der nur eine einzige Bande nachzuweisen ist. Ebenfalls nur eine Bande konnten Schreitmüller et al., (1987) bei

der Westernblotanalyse nach Immundetektion mit ITI spezifischen Antikörpern sehen (Molekularmasse 240 kD) . Die intermolekularen Bindungen dieses Komplexes können auch unter stark denaturierenden und reduzierenden Bedingungen (SDS, 6 M Harnstoff, β -Met) nicht aufgelöst werden (Gebhard and Hochstrasser, 1986).

1.3.3 Physiologische Funktion von ITI und ITI-Derivaten

Über die Funktion von ITI und seinen Derivaten gibt es bisher nur wenig Anhaltspunkte. Untersuchungen darüber sind erschwert, da bisher keine embryonalen Defizienzen beobachtet wurden. Die Bestimmung der C-terminalen Aminosäuren von aus Serum isoliertem HI-30 spricht für die Spaltung durch eine trypsinähnliche Proteinase (Reisinger et al., 1985). Die sehr kleine Dissoziationskonstante des menschlichen ITI/Trypsin-Komplexes (Bieth et al., 1974; Aubry & Bieth, 1976) läßt jedoch Trypsin als physiologisches Zielenzym für eine solche Spaltung kaum in Frage kommen. Nach in vitro Untersuchungen (Dietl et al., 1979) ist die Granulozytenelastase das potenteste Enzym bei der Freisetzung des inhibitorischen HI-30 Fragmentes. Da Entzündungsprozesse eine erhöhte Liberierung von proteolytischen Enzymen aus polymorphkernigen Granulozyten verursachen und mit gleichzeitig erhöhten Serumwerten und Exkretionsraten des HI-30 Fragmentes einhergehen (Hochstrasser et al., 1974), vermuteten Dietl et al. (1979) , daß die Spaltung auch in vivo durch Granulozytenelastase erfolgt. Die langen Kohlenhydratseitenketten des physiologischen HI-30 Fragmentes könnten die hohe Diffusionsrate erklären: ITI Derivate werden nämlich außer im Plasma und Serum auch in Urin und Bronchialschleimhaut gefunden. Salier et al. (1983) fanden jedoch bei Entzündungsprozessen außer erhöhten Konzentrationen der ITI-Derivate nicht auch eine gleichzeitige Abnahme der ITI Konzentration selbst, was bei einem erhöhten Turnover zu erwarten gewesen wäre. Ebenfalls erhöhte Konzentrationen an HI-30 bei konstanter Serumkonzentration von ITI wurden auch bei Tumorpatienten beobachtet (Chawla et al., 1978, 1984; McKeehan et al., 1986). Ein niedermolekulares Protein, von Rudman et al. (1976) aus dem Urin von Patienten mit akuter myelozytischer Leukämie isoliert , wurde

von Chawla et al. (1978) als HI-30 Fragment identifiziert. Dieses Fragment ist wahrscheinlich mit dem säurestabilen HI-30 identisch. Im Urin von Patienten mit neoplastischen Krankheiten wird es in 30-60 % der Fälle in Konzentrationen von 100-500 mg/Tag ausgeschieden. Die Exkretionsrate im Urin von Kontrollpersonen liegt unter 1 mg/Tag. Diese Beobachtung spricht damit ebenfalls gegen die Annahme, daß ITI als Vorläufermolekül für die kleineren säurestabilen Fragmente in Frage kommt.

Jüngste Ergebnisse (Carrell , 1988; Ponte et al., 1988; Tanzi et al., 1988; Kitaguchi et al., 1988) weisen die Existenz einer Domäne mit Proteinaseinhibitorsequenz (Kunitz-Familie) im Amyloid β - Protein von Alzheimer Patienten nach. Diese Sequenz besitzt interessanterweise 50% Strukturidentität zur zweiten Domäne des ITI und 50% Homologie zur Sequenz des bovinen pankreatischen Kunitz-Trypsininhibitors (BPTI).

2 Chromosomale Genstrukturen

Viele Fragen bezüglich des Biosyntheseortes, der weiteren Veränderung auf ihren Transportwegen zu den Zielorganen sowie der physiologischen Funktion des Inter-alpha-Trypsininhibitors (ITI), urinären Trypsininhibitors (UTI) und anderen verwandten Trypsininhibitoren aus Serum und Urin sind noch offen. Durch Untersuchung der genomischen Organisation von Inhibitoren können Anhaltspunkte über deren Struktur und Funktion erhalten werden. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente für die vorliegende Dissertation war die genomische Struktur einiger anderer Proteinaseinhibitoren bereits analysiert und charakterisiert worden.

2.1 α_1 -Antitrypsin, α_1 -Antichymotrypsin, Ovalbumin

Mittels Restriktionskartierung, Elektronenmikroskopie einer Heteroduplexhybridisierung zwischen klonierter chromosomaler DNA und mRNA sowie teilweise Sequenzieren konnten bisher die Genloci von zwei Serin-Proteinaseinhibitoren, α_1 -Antitrypsin und α_1 -Antichymotrypsin, analysiert werden (Kidd and Woo, unpublizierte Daten). Das α_1 -Antitrypsingen umfaßt etwa 14 kb und enthält fünf Exons, das α_1 -Antichymotrypsingen hat eine Genlänge von etwa 10 kb und besitzt vier Exons (Abb. 3). Exon II des α_1 -Antichymotrypsingens besitzt eine extreme Sequenzähnlichkeit zu Exon II des α_1 -Antitrypsingens. Beide beinhalten das AUG Startcodon für die Translation und enden bei Nukleotid 693 der cDNA Sequenz. Exon III und IV des α_1 -Antitrypsingens werden jedoch durch ein einziges Exon, Exon III, im α_1 -Antichymotrypsingen repräsentiert. Die relativen Intronlängen im α_1 -Antichymotrypsingen unterscheiden sich ebenfalls von denen des α_1 -Antitrypsingens.

Die Intron-Exon Lokalisationen des menschlichen α_1 -Antitrypsingens, des menschlichen α_1 -Antichymotrypsingens und des Ovalbumingens wurden miteinander verglichen. Da alle drei Inhibitoren derselben Superfamilie angehören, wurde erwartet, daß diese Gene dasselbe Exon-Intron Muster aufweisen (Hunt, 1980). Das chicken Ovalbumingen jedoch enthält 7 Introns (Breathach, 1978), das menschliche α_1 -Antitrypsingen vier (Long, 1984), und das menschliche α_1 -Antichymotrypsingen besitzt drei Introns (Kidd and Woo, unpublizierte Beobachtung). Die drei Introns im menschlichen α_1 -Antitrypsingen und zwei Introns im menschlichen α_1 -Antichymotrypsingen befinden sich im 3' Bereich der entsprechenden mRNA, wohingegen alle sieben Introns im Hühner-Ovalbumingen in der 5' Hälfte der mRNA liegen.

Das Hühner-Ovalbumingen unterscheidet sich bezüglich Position, Größe und Zusammensetzung der Introns in einer Region, in der die Proteinsequenzhomologie sehr groß ist, drastisch vom menschlichen α_1 -Antitrypsin- und α_1 -Antichymotrypsingen. Größe und Position der Introns im menschlichen α_1 -Antichymotrypsin- und α_1 -Antitrypsingen sind ebenfalls deutlich verschieden voneinander. Es ist deshalb gegenwärtig unmöglich zu entscheiden, ob menschliches α_1 -Antitrypsin und Hühner-Ovalbumin durch konvergente oder divergente Evolution entstanden sind. Da das α_1 -Antitrypsin- und das Ovalbumingen eine unterschiedliche Anzahl von Introns besitzen, die an verschiedenen Stellen

in den Exonsequenzen lokalisiert sind, liegt die Vermutung nahe, daß das beiden gemeinsame Urgen vor der Addition und Deletion der Intronsequenzen dupliziert wurde. Sowohl das menschliche α_1 -Antitrypsin (Lai, 1983) als auch das menschliche α_1 -Antichymotrypsin (Kidd and Woo, in Vorbereitung) befinden sich auf Chromosom 14. Durch Hybridisierungsanalyse konnte gezeigt werden, daß beide Gene in Richtung 3' des jeweiligen Strukturgens, 12-14 kb beim α_1 -Antitrypsin bzw. 10-12 kb beim α_1 -Antichymotrypsin, ein sequenzverwandtes Gen besitzen.

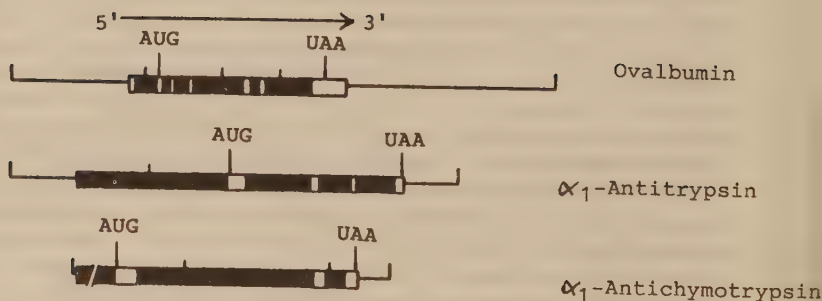


Abb. 3. Vergleich der Genstrukturen von α_1 -Antitrypsin, α_1 -Antichymotrypsin und Ovalbumin
 Schwarzer Balken: Intron
 Weißer Balken: Exon
 Es sind jeweils Anfang (AUG) und Ende (UAA) der Transkription angezeigt.

2.2 Boviner pankreatischer Trypsininhibitor

Kingston and Anderson (1986) fanden zwei mindestens 11 kb im bovinen Genom voneinander entfernte (Anderson & Kingston, 1983) DNA-Sequenzregionen, die sich in nahezu identischer genetischer Sequenzumgebung befinden.

Eine der beiden Regionen, 3998 bp lang, kodiert für den BPTI (boviner pankreatischer Trypsininhibitor), die andere ist 3919 Nukleotide lang und kodiert für den Milz Inhibitor II (SI). Beide Gene bestehen aus drei Exons und zwei Introns. Das mittlere Exon kodiert für das reife Protein, während die anderen beiden amino- und carboxyterminale Extensionen von 33 oder 35 und 7 Aminosäuren definieren. Das bedeutet, daß die mRNA außerhalb der kodierenden Region gespleißt wird und beide Proteine als längere Vorstufenmoleküle synthetisiert werden. Die N-terminalen Extensionen besitzen alle Charakteristiken eines Signalpeptids, welches für den Durchtritt von Proteinen in das Endoplasmatische Reticulum verantwortlich ist (von Heijne, 1983). Das reife Protein des BPTI wird nur in Geweben, nicht in Flüssigkeiten gefunden (Fritz & Wunderer, 1983). Da Protein- und mRNA-Gehalt in den unterschiedlichen Geweben ähnlich sind (Kingston & Anderson, 1986), ist das reife Protein für eine intrazelluläre Organelle bestimmt, wie die Granula in den Mastzellen, zu denen BPTI histochemisch lokalisiert wurde (Fitz et al., 1979).

Im Gegensatz dazu, könnte das SI-Protein aus den Geweben exportiert werden, da das reife Protein nicht in der Lunge gefunden wurde, aus der ihre mRNA isoliert wurde. Die beiden Sequenzen sind über 3.4 kb auffallend ähnlich zueinander und unterscheiden sich nur in 100 Nukleotiden (2.9 %). Auffallend ist, daß sich einige der variablen Basen in Kodons innerhalb der Protein kodierenden Region befinden, die sich im Enzym/Inhibitor Komplex an der Kontaktfläche befinden. Obwohl es sich dabei um konservative Austausche handelt, könnten sie die Interaktion des Inhibitors mit verschiedenen Proteinasen beeinflussen. Die Ähnlichkeiten zwischen den beiden Sequenzen lassen vermuten, daß dieses Segment erst kurze Zeit zuvor im bovinen Genom dupliziert wurde oder einer Genkonversion unterlag.

Jedes dieser beiden Gene existiert nur einmal im bovinen Genom (Anderson & Kingston, 1983). Keine der beiden homologen Sequenzen besitzt irgendwelche Charakteristiken von

Pseudogenen, wie z. B. von kurzen Repeats oder 3' Poly A Enden flankiert.

2.3 Pankreatischer sekretorischer Trypsininhibitor

Der menschliche pankreatische sekretorische Trypsininhibitor (PSTI) ist ein einkettiges Polypeptid bestehend aus 56 Aminosäuren. Die DNA-Sequenzanalyse zeigte, daß das menschliche PSTI Gen 7.5 kb lang und in vier Exons unterteilt ist. Die Aminosäure kodierende Region startet in Exon 1 und endet in Exon 4. Das Signalpeptid endet bei Ala an der Aminosäureposition -1 im Zentrum von Exon 2. Das Gen besitzt mehrere Transkriptionsstartpunkte. Es wurden keine typischen TATA oder CAAT Consensussequenzen gefunden. Diese Eigenschaften, das Vorhandensein mehrerer Transkriptionsstartpunkte sowie das Fehlen der CAAT- oder TATA Box werden auch in einigen anderen menschlichen Genen, dem für die HMG CoA Reduktase (Reynolds et al., 1984), dem EGF Rezeptor (Ishii et al., 1985) sowie dem HPRT (Patel et al., 1986) gefunden. Ein Vergleich der cDNA Sequenzen von menschlichem PSTI und menschlichem EGF läßt erkennen, daß die Sequenzen zu 50% homolog sind (Wilbur et al., 1983).

Das PSTI Gen wird in verschiedenen Organen unter unterschiedlichen physiologischen und pathologischen Bedingungen exprimiert: Halila et al. (1985) fanden unter Verwendung eines RIA, daß der Serum PSTI-Level nach Pankreasektomie im normalen Mengenbereich blieb, wohingegen Matsuda et al. (1983 und 1985) sowie Ogawa et al. (1985) berichteten, daß die PSTI Konzentration bei Patienten, die an bösartigen Krankheiten oder Verletzungen leiden, ansteigt.

Die Southernblotanalyse zeigte, daß nur ein PSTI Gen im Genom des Menschen vorkommt (Yamamoto et al., 1985). Es befindet sich auf Chromosom 5 (Horii et al., 1987).

ITI unterscheidet sich von den bisher beschriebenen humanen Inhibitoren durch die Zwei-Domänen-Struktur. Außerdem werden bei diesem Inhibitor zusätzlich zu der inhibitorisch aktiven Komponente (L-Kette) weitere Sequenzen (H-Kette) mit bisher unbekannter Funktion beschrieben, die keine Sequenzverwandtschaft zur inhibitorisch aktiven Domäne erkennen lassen und bei den bisher analysierten Inhibitoren nicht gefunden wurden. Die zur Verfügung stehenden Aminosäure- und cDNA Sequenzdaten des Inter- α -Trypsininhibitors ermöglichen keine weitere Strukturanalyse des ITI-Moleküls als die bisher beschriebenen Daten. Zur näheren Untersuchung der Struktur und auch der Funktion des Serin-Proteinaseinhibitors ITI ist deshalb die Charakterisierung der genomischen Organisation dieses Inhibitors erforderlich. Durch sie können im weiteren Positionen von Introns und regulatorischen Steuerelementen bestimmt werden, die zusätzlich zur pathophysiologischen Analyse dieses Inhibitors Aufschluß erteilen über die Regulation der Expression der beiden Gene.

Zielstellung der vorliegenden Dissertation war es dabei, eine genomische DNA Bank herzustellen und mit Hilfe der zum Zeitpunkt der Durchführung vorhandenen cDNA Sonden (eine für die H- und eine für die L-Kette) zu screenen. Die klonierten ITI spezifischen Fragmente sollten durch Restriktionskartierung und Hybridisierungsanalyse mit den radioaktiv markierten Sonden charakterisiert werden, um folgende Fragen zu beantworten:

1. Wieviel ITI Gene zu diesen Sonden existieren im Genom?
2. Welche Größe besitzt(en) das (die) ITI Gen(e)?
3. Welche genomische Struktur besitzen das (die) ITI Gen(e)?

C Ergebnisse

Voraussetzung für eine genomische Strukturanalyse des ITI ist die Klonierung von ITI spezifischen DNA Sequenzen, da nur auf diese Weise genügend Material in reiner Form zu gewinnen ist. Für die Identifizierung humaner ITI homologer Sequenzen konnten nacheinander zwei verschiedene cDNA Klone zur Verfügung gestellt werden, die durch Screenen einer Lambda gt11 Expressionsgenbank mit ITI spezifischen Antikörpern identifiziert worden waren. Einer der beiden cDNA Klone kodiert für eine schwere (H-Kette), der andere für eine leichte Kette (L-Kette) des Inter- α -Trypsininhibitors. Die Sequenzen beider cDNA Klone besitzen unterschiedliche 3' Enden. Damit ist es möglich, daß zwei verschiedene, zu diesen komplementäre mRNA Moleküle existieren, die für unterschiedliche Proteine des ITI kodieren.

1 Nachweis und Identifizierung von ITI H-Ketten spezifischen Sequenzen im Genom durch Hybridisierung mit der piti cDNA

Der erste durch immunologischen Nachweis isolierte und charakterisierte cDNA Klon (piti), ein Partialklon, besitzt eine Länge von 2.26 kb einschließlich des 3' Poly-A Endes (Schreitmüller et al., 1987). Der für 682 Aminosäuren kodierende offene Leserahmen repräsentiert ein Protein mit einem Molekulargewicht von 77 kD. Die von den cDNA Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen waren durch Übereinstimmung mit teilweise bekannten Aminosäuresequenzdaten von aus Serum isoliertem ITI verifiziert worden. Die Bedeutung der aus der piti cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenzen für das Inhibitor-molekül war unklar. Aus neueren Literaturarbeiten ist bekannt, daß die komplette cDNA eine Länge von 3089 bp besitzt und für ein Protein mit 946 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 106.5 kD kodiert (Gebhard et al., 1988). Diese zweite Proteinkomponente enthält ebenso wie die α 1-Mikroglobulin UTI Komponente (Kaumeyer et al.,

1986), welche die Kunitz Inhibitor-domänen repräsentiert, Glykosylierungsstellen. Sie wird als die schwere Kette des Inter-alpha-Trypsin-Inhibitors bezeichnet.

1.1 Präparation der piti cDNA Sonde

Die für die schwere Kette des Proteins kodierende cDNA piti war über die EcoRI Spaltstelle in das Plasmid pTZ 19R einkloniert. Sie wurde nach Transformation kompetenter JM83 Bakterienzellen und anschließender präparativer Anreicherung zunächst über einen Cäsiumchlorid-Gradienten gereinigt.

Um eine Kreuzhybridisierung des Vektoranteils des piti cDNA Klons sowohl mit bakteriellen als auch mit Phagensequenzen auszuschließen, wurde das Insert nach EcoRI Verdau mittels Elektroelution isoliert.

1.2 Southernanalyse von genomischer DNA mit der piti cDNA

Humane Lymphozyten DNA wurde isoliert (E 2.1.1) und mit den Restriktionsenzymen (Hexanukleasen) BamHI, EcoRI und HindIII gespalten, deren Spaltstellen auf der genomischen DNA statistisch alle 5 kb auftreten. Nach Enzymverdau wurden die entstandenen Fragmente auf einem Agarosegel (0.8%) aufgetrennt. Ein kompletter Verdau wurde bei allen drei Enzymen durch das Auftreten mehrerer spezifischer Banden ersichtlich. Diese Banden stellen typischerweise repetitive Wirtssequenzen dar, die Schnittstellen für die getesteten Restriktionsendonukleasen besitzen.

Nach Hybridisierung mit der piti Sonde (Spezif. Aktivität 8×10^5 cpm/ug) wurden die Filter bei -80°C exponiert.

Abb. 4 zeigt eine Gegenüberstellung zweier Autoradiogramme des gleichen Nitrocellulosefilters nach unterschiedlichen Expositionszeiten (2h und 20h). Nach 2 stündiger Exposition ist bei Verdau mit der Restriktionsendonuklease BamHI eine einzige Bande zu sehen, die stärker als alle übrigen Banden des Autoradiogrammes hybridisiert (möglicherweise Doppelbande). Ihre Größe liegt bei ca. 11 kb. Bei Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII sind neben einer höhermolekularen Bande von etwa 20 kb (EcoRI) und 11 kb (HindIII) jeweils zusätzliche schwächere Banden von 6.5 kb (EcoRI) sowie 6.0 kb und 2.0 kb (HindIII) zu erkennen (Tab. I).

Nach 20 stündiger Exposition tritt in der mit EcoRI verdauten DNA eine zusätzliche schwache Bande von 1.5 kb auf.

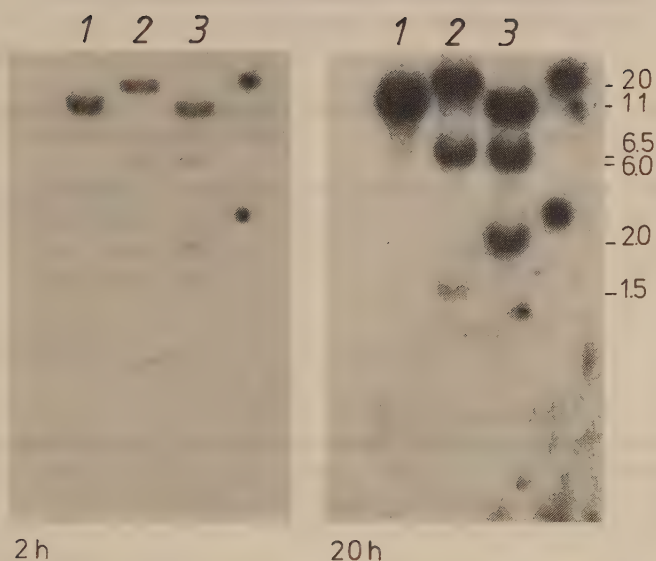


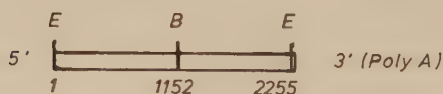
Abb. 4. Southernanalyse von genomischer DNA mit der pit1 cDNA.

Humane Leukozyten DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen BamHI (Spur 1), EcoRI (Spur 2) und HindIII (Spur 3) geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt (0.8% Agarose), auf einen Nitrocellulosefilter übertragen (E 2.6) und gegen die für die schwere Kette des Inter-alpha-Trypsininhibitors kodierende pit1 Sonde (C 1.1) hybridisiert (E 2.7.2). Die Filme wurden 2h und 20h exponiert. Die Fragmentgrößen sind in kb angegeben.

Tab. I. Anzahl und Größe der hybridisierenden Fragmente nach Southernanalyse von genomischer DNA mit der piti cDNA nach 20h Exposition.

Enzym	Anzahl der hybridisierenden Banden	Größe der hybridisierenden Banden (kb)
BamHI	1	11.0 (möglicherweise Doppelbande)
EcoRI	3	20.0; 6.5; 1.5
HindIII	3	11.0; 6.0; 2.0

Die Schnittstellen der piti cDNA (Partialklon) für die Restriktionsendonukleasen BamHI, EcoRI und HindIII waren bekannt (Schreitmüller et al., 1987 Abb. 5):



Enzym	Anz. der Spaltstellen	Fragmente (bp) (5' → 3')
BamHI	1	1152; 1108
EcoRI	2	2255; 5;
HindIII	0	2260

Abb. 5. Schnittstellen der piti cDNA Sonde für die Restriktionsendonukleasen BamHI, EcoRI und HindIII (nach Schreitmüller et al., 1987).

Somit sind für die genomische Organisation des H-Ketten Gens (piti) folgende Möglichkeiten denkbar (Schemazeichnungen) betrachtet man sich als einfachsten Fall die Analyse mit HindIII (Abb. 6A, B, C):

(a) Ein Gen (Abb. 6A)

Alle HindIII (H) Spaltstellen liegen in nicht kodierenden Regionen desselben Gens. Die Genlänge beträgt dann mindestens 19.0 kb.

(b) Zwei Gene (Abb. 6B)

Die höhermolekulare Bande im Autoradiogramm, die nach Spaltung mit der Restriktionsendonuklease HindIII erzeugt wird, stellt eine Einfachbande dar. Ihre Nukleotidsequenzen kodieren für eines der beiden Gene.

Die Schnittstellen für HindIII können dann wie folgt positioniert sein:

(α) Position 2 und 4 d. h. HindIII schneidet zwischen den beiden Genen und einmal in den Intronsequenzen eines der beiden Gene.

(β) Position 1 oder 3 und Position 4 d. h. HindIII schneidet nur in den nicht kodierenden Regionen der beiden Gene.

c) Vier Gene (Abb. 6C)

Im Southernblot sind eine Doppel- und zwei Einfachbanden zu sehen. Die HindIII Schnittstellen befinden sich entweder in den Sequenzabschnitten zwischen den Genen (Pos. 2) oder am Rande der Gene in den Intronbereichen (mögliche Positionen mit 1 oder 3 bezeichnet).

Durch die Southernanalyse von humaner Leukozyten DNA mit der μ ti cDNA kann keine eindeutige Aussage über die im Genom vorhandene Anzahl an μ ti-H-Ketten Genen sowie deren Größe gemacht werden. Es können ein, zwei oder vier Gene existieren.

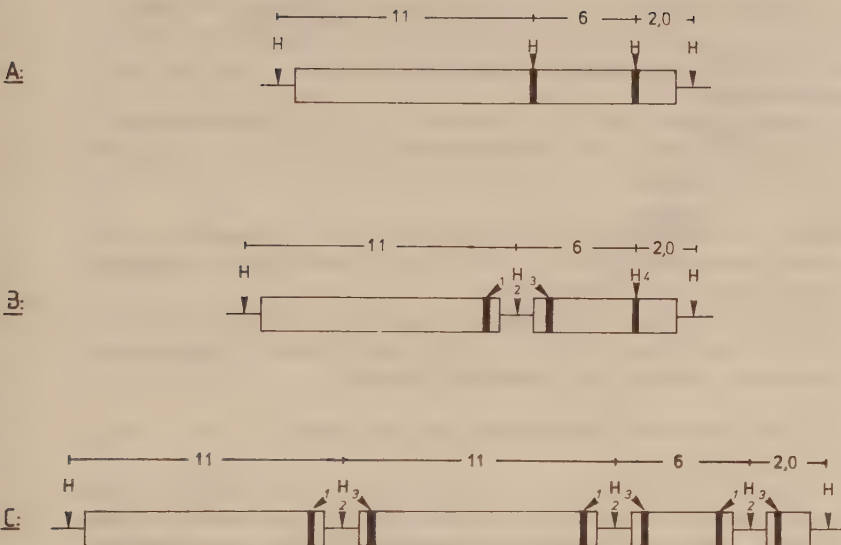


Abb. 6. Erklärungsmodelle für die Southernanalyse von Leukozyten DNA mit der *piti cDNA* (Partialklon).

A: Ein Gen

B: Zwei Gene

C: Vier Gene

Schwarzer Balken: Intron

Zahlen zwischen zwei HindIII (H) Spaltstellen: Länge in kb

1.3 Klonierung

1.3.1 Anlegen einer Genbank im Lambda Phagen EMBL4

Zur Klonierung genomischer DNA wurden Methoden von Maniatis et al. (1982) und Frischauf et al. (1983) herangezogen. Die Klonierungsstrategie ist in Abb. 7 schematisch wiedergegeben.

Als Vektor wurde EMBL4 (Frischauf et al., 1983) gewählt, der sich durch zwei Eigenschaften für die Klonierung besonders eignet:

EMBL4 ist ein Substitutionsvektor, der, ausgehend von einer Gesamtgenomlänge von 44 kb, eine Klonierungskapazität von 9-23 kb besitzt.

Aufgrund multipler Restriktionsspaltstellen zwischen Armen und zentralem, durch klonierbare Inserts ersetzbarem Fragment, besitzt er folgende Vorzüge:

a. Eine größere Flexibilität bei der Auswahl von Enzymen zum Klonieren

b. Nach Doppelverdau mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und SalI und anschließender Isopropanolfällung bleiben die endständigen kleinen Polylinkerfragmente sowie das mittlere kleinere SalI-Fragment in Lösung, wodurch die Religierung des zentralen Fragmentes verhindert und somit keine Reinigung der Arme vom zentralen Fragment notwendig ist.

c. Der Vektor trägt als Selektionsmarker den spi^- (sensitive to P2-interference) Phänotyp, d.h. der Phage trägt auf dem mittleren BamHI Fragment, das durch rekombinante DNA zu ersetzen ist, die Gene *red* und *gam*. Er ist deshalb nicht in der Lage, auf P2 lysogenen Bakterien zu wachsen. Rekombinante Phagen hingegen, in denen dieses zentrale Stück ersetzt ist, haben den spi^+ -Phänotyp und bilden auch auf P2-lysogenen Wirtsbakterien Plaques. Das bedeutet, daß es mit Hilfe unterschiedlicher Bakterienstämme möglich ist, zwischen Wildtyp- und rekombinanten Phagen zu unterscheiden. Als permissiver Wirt wurde Q358, als restriktiver Wirt Q359 verwendet.

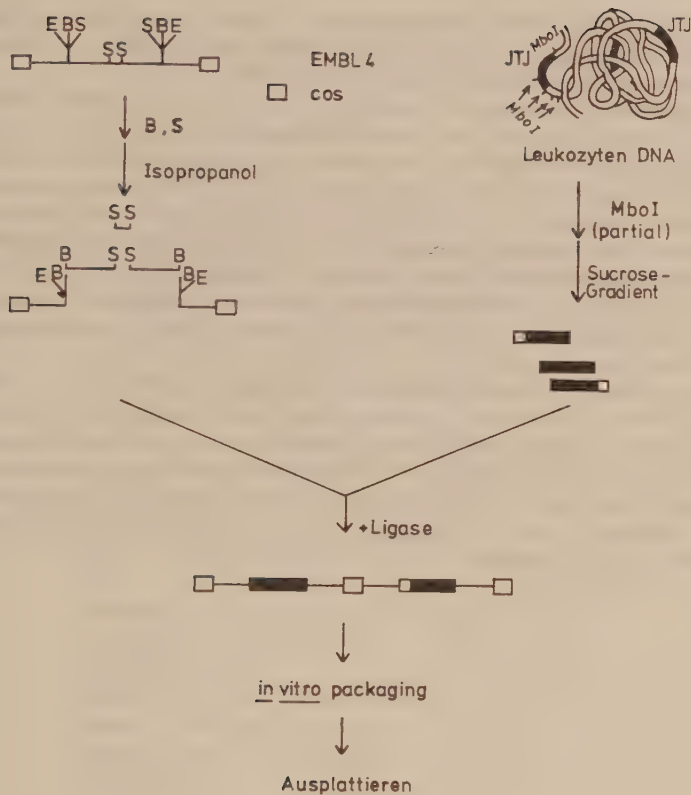


Abb. 7. Klonierungsstrategie.

Leukozyten DNA wurde mit MboI partial verdaut (E 2.12.2) und über einen Sucrose-Dichtegradienten der Größe nach fraktioniert (E 2.12.3). Fragmente, 12-23 kb, wurden gepoolt, mit SalI (S) und BamHI (B) verdauter EMBL4 Vektor DNA ligiert (E 2.12.5), in vitro verpackt (E 2.12.7) und die gewachsenen Plaques durch Hybridisierung mit der ^{32}p markierten piti Sonde (C1.1) auf Anwesenheit des Inter-alpha-Trypsininhibitor H-Kettengens untersucht.

Die einzelnen Phagenkomponenten sowie die Vektor DNA wurden präpariert und die Effizienz des Systems in Kontrollversuchen überprüft und optimiert.

Unverdaute, unverdaut ligierte, sowie BamHI, BamHI und Sali geschnittene und nach Schneiden wieder mit sich selbst ligierte Vektor DNA wurde in vitro verpackt, auf dem Wirtsstamm Q358 ausplattiert und die entstandenen Plaques ausgezählt. Die Ergebnisse wurden auf Anzahl Plaques pro μ g DNA umgerechnet. Als Kontrolle dienten Verpackungsextrakte ohne eingeschleuste DNA. Die Anzahl der entstandenen Plaques diente als Maß für die Effizienz der Verpackung. Die Ergebnisse sind in Tab. II wiedergegeben.

Die Extrakte enthalten keine endogene DNA (Kontrolle ohne DNA). Spaltung und Religierung der Vektorpräparationen erfolgten effizient. Nach BamHI- und Sali-Verdau erfolgte die Verpackung von lebensfähigen Phagen nur noch zu $5 \times 10^{-4}\%$. Die Effizienzen der beiden Verpackungsextrakte liegen in der Größenordnung von Literaturangaben (Matiatis et al., 1982).

Tab. II. Verpackungseffizienz von EMBL4 Vektor DNA.

Vektor DNA wurde wie in E 2.12.2 beschrieben gespalten und in vitro in Phagenköpfe verpackt (E 2.12.7). Die Phagen wurden auf dem Wirtsstamm Q358 ausplattiert (E 2.12.7), die entstandenen Plaques gezählt und auf Anzahl Plaques pro μg umgerechnet.

EMBL4 Vektor DNA	Plaques/ μg
unverdaut	3.0×10^8
unverdaut ligiert	2.0×10^7
BamHI verdaut	6.8×10^4
BamHI verdaut und ligiert	7.5×10^7
BamHI und SalI verdaut	1.5×10^3
BamHI und SalI verdaut und ligiert	3.0×10^3
Kontrolle (keine DNA)	0

Um einer echten Zufallsfragmentierung der zu klonierenden DNA möglichst nahe zu kommen, wurde humane Leukozyten DNA mit MboI partial verdaut (E 2.12.2 und Abb. 8). Der Vorteil der Methode des Partialverdaus liegt darin, daß man hierbei überlappende DNA-Fragmente erhält, die jede bestimmte Sequenz redundant, d. h. also nach Klonierung auf mehreren überlappenden Phageneinzelklonen, enthalten. Somit ergibt sich bei diesem Klonierungsprinzip auch die Möglichkeit, die Struktur größerer genetischer Bereiche (Genabschnitte) von einem Punkt aus, mit Hilfe der "Chromosomal Walking" Technik, zu analysieren (Weiss et al., 1984; Steinmetz, 1984). Die optimale Enzymkonzentration wurde anhand der stärksten Fluoreszenzintensität im Größenbereich 12-23 kb ermittelt (Abb. 8, Spur 7). Um die Zufallsverteilung der Fragmente, die kloniert wurden, weiter zu erhöhen, wurde der Spaltansatz, der die meisten Fragmente im klonierbaren Größenbereich aufwies, mit den Spaltansätzen der nächstgeringeren sowie der nächsthöheren Enzymkonzentration vereinigt. Nach Sucrose-Gradientenzentrifugation der ausgewählten Spaltansätze (Abb. 9) wurden Fragmente zwischen 12-23 kb vereinigt (Fraktion 12-20). Die Selektion dieser Fragmentgrößen sollte verhindern, daß kleinere, im Genom natürlicherweise nicht benachbarte Fragmente ligiert und somit gemeinsam verpackt werden.

Anschließend wurde das Ligierungsverhältnis Vektor DNA:Leukozyten DNA im Hinblick auf die resultierende Verpackungseffizienz untersucht (E 2.12.5). Dazu wurden Vektor DNA und Leukozyten DNA nach Verpackung auf den beiden Wirtstämmen (Q358 und Q359) ausplattiert. Ein Verhältnis von 4:1 (EMBL4 Vektor DNA : Leukozyten DNA = w/w) erwies sich als optimal (Tab. IIIa). Daneben wurde der Prozentsatz an rekombinanten gegenüber der Anzahl an nicht rekombinanten Phagen bestimmt (Tab. IIIb).

Da die Verpackung der EMBL4 Vektor DNA effizient erfolgt ist (Tab. II und Tab. IIIa), könnte die relativ geringe Anzahl rekombinanter Phagen (57%) ein Hinweis dafür sein, daß sehr viele Fragmente mit Größen im oberen Verpackungslimit verpackt wurden, wodurch die Wachstumseffizienz der rekombinanten Phagen insgesamt vermindert wurde. Auffallend war, daß rekombinante Phagen auf Q359 sehr kleine Plaques bildeten.

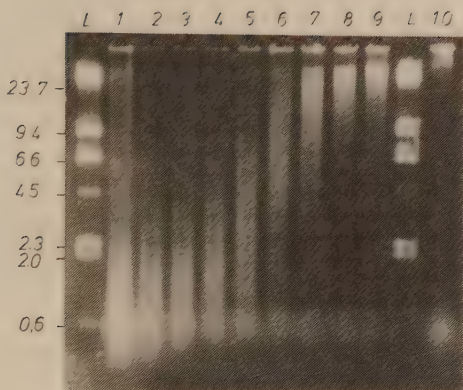


Abb. 8. Partialverdau von genomischer DNA mit verschiedenen Enzymkonzentrationen.

Jeweils 1 μ g Lymphozyten DNA wurde mit unterschiedlichen Mengen an MboI verdaut (1h 37⁰C). Das Ausmaß der Spaltung wurde auf einem 0,4% Agarosegel überprüft. Die optimale Enzymkonzentration wurde anhand der stärksten Fluoreszenzintensität im Größenbereich 12-23 kb ermittelt (Spur 7). Als Längenstandard diente Lambda DNA mit HindIII geschnitten (Spur L).

Spur 1 (2U/ μ g), Spur 2 (1 U/ μ g), Spur 3 (0.5 U/ μ g), Spur 4 (0.25 U/ μ g), Spur 5 (0.12 U/ μ g), Spur 6 (0.06 U/ μ g), Spur 7 (0.03 U/ μ g), Spur 8 (0.015 U/ μ g), Spur 9 (0.006 U/ μ g), Spur 10 (Kontrolle, 0 U/ μ g)

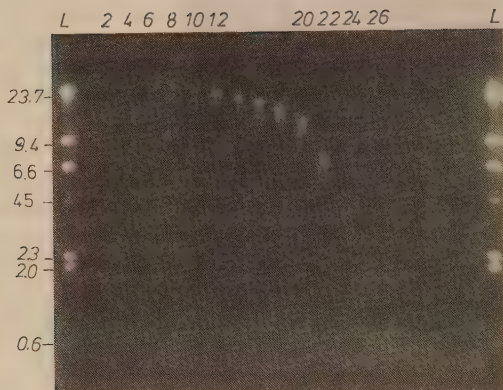


Abb. 9. Gelelektrophoretische Analyse von fraktionierter DNA nach Sucrose-Gradientenzentrifugation.

Mit MboI partial verdaute Lymphozyten DNA (E 2.12.2) wurde durch Sucrose-Gradientenzentrifugation der Größe nach fraktioniert (E 2.1.3). Aliquots jeder zweiten Fraktion wurden gelelektrophoretisch (0.6% Agarose) untersucht (E 2.4). Die Fraktionen 12-20 (Fragmentgrößen 12-23 kb) wurden gepoolt, gereinigt und mit den EMBL4 Vektorarmen ligiert (E 2.12.5).

Als Längenstandard (L) diente Lambda DNA mit HindIII geschnitten (Spur L). Die Fragmentgrößen sind in kb angegeben.

Tab. IIIa. Verpackungseffizienz von EMBL4 DNA mit Leukozyten DNA ligiert.

EMBL4 DNA wurde mit BamHI und SalI verdaut (E 2.12.1), im angegebenen Verhältnis mit humaner Leukozyten DNA ligiert (E 2.12.5) und anschließend auf den beiden selektiven Wirtstämmen ausplattiert. Als Kontrolle dienten Verpackungsextrakte ohne EMBL4 DNA.

EMBL4 DNA mit huma- ner Leukozyten DNA ligiert	Q358	Q359	Kontrolle
--	------	------	-----------

5 : 1	2.3×10^6	1.0×10^6	0
4 : 1	2.6×10^6	1.5×10^6	0
3 : 1	2.5×10^6	1.0×10^5	0
2 : 1	3.0×10^5	1.0×10^5	0
1 : 1	7.5×10^4	2.6×10^4	0

Tab. IIIb. Prozentualer Anteil rekombinanter Phagen der verschiedenen Ligierungsverhältnisse von a.), ermittelt mit Hilfe der selektiven Bakterienstämme Q358 und Q359.

% Rekombinante

5 : 1	43.5
4 : 1	57
3 : 1	40
2 : 1	38
1 : 1	35

Die Anzahl rekombinanter Phagen und damit die Güte der Genbank kann zusätzlich durch den Nachweis der repetitiven Alu-Sequenzen auf den klonierten Fragmenten beurteilt werden. Daher wurden Phagenplaques, die auf beiden Selektivstämmen (Q358 und Q359) gewachsen waren und bei denen EMBL4 Vektor DNA und Leukozyten DNA im optimalen Verhältnis ligiert vorlagen, von den Agarplatten auf Nitrocellulosefilter übertragen und gegen eine ^{32}P markierte, 300 bp lange Alu-Sequenz (Deininger et al., 1981) hybridisiert. Diese Sequenzen treten alle 6-8 kb über das gesamte Genom verstreut auf und sollten damit in allen klonierten Insertfragmenten nachzuweisen sein. Sie sind gelegentlich auch in Introns und zwischen den Genen zu finden. Ergebnisse dieser Hybridisierung sind in Tab. IV wiedergegeben. 55% aller Rekombinanten enthielten Alu-Sequenzen.

Tab. IV. Nachweis von Alu Sequenzen auf den klonierten Fragmenten der EMBL4 Phagen.

EMBL4 Phagen mit klonierter humaner Leukozyten DNA (Vektor DNA/Insert DNA = 4:1) wurden auf Q358 und Q359 vermehrt (E 2.12.7). Die DNA wurde auf Nitrocellulosefilter fixiert (E 2.6) und gegen eine ^{32}P markierte Alu-DNA Sonde hybridisiert (E 2.7.2). Der prozentuale Anteil positiver Signale wurde mittels der Gesamtzahl Plaques auf den beiden Stämmen bestimmt. Als Kontrolle dienten Phagen mit unverdauter verpackter EMBL4 DNA.

% Alu positiv:

	Q358	Q359
EMBL4 DNA / Leukozyten-DNA ligiert (4:1)	55	55
Kontrolle	0	0

Die aus Tab.IIIa ersichtliche Verpackungseffizienz von 1.5×10^6 unabhängigen Phagen reichte aus, um mit 1.0 μg klonierter Leukozyten DNA genügend rekombinante Phagenklone zu erhalten. Denn unter Beachtung der Größe des menschlichen Genoms von 3×10^9 bp und der durchschnittlichen statistischen Verteilung der Spaltstellen von MboI (Tetranuklease) von 256 bp, ergeben sich bei MboI Verdau etwa 1.2×10^7 verschiedene MboI Fragmente à 256 bp. Bei einem Partialverdau ist ein erheblicher Teil dieser Fragmente entweder zu klein oder zu groß, um nach der Ligierung mit der EMBL4 DNA verpackt zu werden. Da auf eine durchschnittliche klonierbare Größe von 17 kb selektioniert wurde, müssen 8×10^5 rekombinante Phagen überprüft werden, um mit 99 % Wahrscheinlichkeit alle zur cDNA komplementären, klonierten Insertfragmente durch Hybridisierung aufzufinden (Clark und Carbon, 1976).

Die Genbank in EMBL4 wurde unter den dargelegten optimierten Bedingungen bezüglich Zufallsfragmentierung (E 2.12.2), Ligierung (E2.12.5) und Verpackung (E 2.12.7), wie in Abb. 7 zu sehen, hergestellt.

1.3.2. Screenen der EMBL4 Genbank mit der piti Sonde

Es wurden insgesamt 8×10^5 Alu positive Plaques mit der nicktranslatierten Sonde gescreent. Nach Exposition des Nitrocellulosefilters über 24 (Filter A), 48 (Filter A und B) und 72 Stunden (Filter B) bei -70°C wurden 7 mit der H-Ketten Sonde (piti) hybridisierende Klone (A1-A7) identifiziert. Abb. 10 zeigt einen der sieben positiven Klone, der ein zur cDNA komplementäres Fragment trägt. Er befindet sich auf den beiden Duplikatfiltern an derselben Stelle.

Die 7 als ITI positiv identifizierten Klone wurden plaquegereinigt. Je nach Größe der gewachsenen Phagenplaques entstanden unterschiedlich große Hybridisierungssignale. Anschließend wurden von allen Klonen Phagenlysate hergestellt.

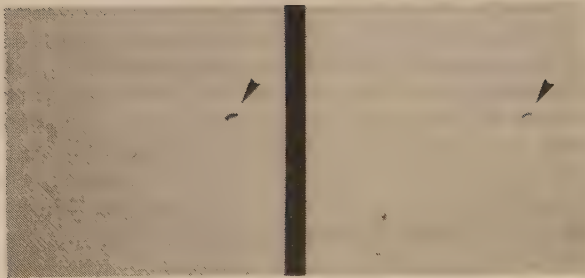


Abb. 10. Plaquehybridisierung von klonierter genomischer DNA mit piti cDNA Sequenzen.

Die Abbildung zeigt ein Signal (Pfeil) desselben Klonen auf dem Filter A (nach 48h; linkes Bild) und dem Filter B (nach 72h; rechtes Bild) an derselben Stelle.

1.3.3 Charakterisierung der piti Phagenklone A1-A5

1.3.3.1 Restriktionsanalyse von A1-A5

Die gelelektrophoretische Auftrennung der isolierten Phagen DNA von A1-A5 (Schnellaufschluß) ließ nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen BamHI, EcoRI und HindIII bei drei Klonen Banden gleicher Größe erkennen. Dies waren die Klone 1, 6 und 7. Daher muß angenommen werden, daß diese drei Klone identisch sind. Als Vertreter dieser Gruppe wurde nur Klon 1 weiterbearbeitet.

Die DNA der 5 gereinigten Phagen (A1-A5) wurde anschließend in präparativem Maßstab isoliert, um auch für spätere Restriktionskartierungen ausreichende DNA Mengen zur Verfügung zu haben.

Nach Verdau mit der Restriktionsendonuklease EcoRI, welche beidseitig am äußersten Rand der Polylinkerseite schneidet, und Agarosegelelektrophorese (0.4%) waren bei allen Klonen, zusätzlich zu den beiden EMBL4 Vektorarmen von 19.2 kb (linker Arm) und 9.24 kb (rechter Arm), Insertfragmente unterschiedlicher Größe zu erkennen (Tab. V und Abb. 11). Nur bei einem Phagenklon (A4) konnte nach EcoRI Verdau das vollständige klonierte Insertfragment von ca. 15 kb herausgespalten werden. Bei drei Phagenklonen (A2, A3, A5) wurde die DNA durch eine zusätzliche EcoRI Spaltstelle im Insertfragment zerlegt. Die Phagenklone besaßen somit jeweils zwei Fragmente von 9.0 kb und 3.0 kb (A2), von 11.5 kb und 1.8 kb (A3) sowie von 13 kb und 1.2 kb (A5). Bei einem Klon (A1) traten 6 EcoRI Spaltstellen im klonierten Insert auf, wodurch jeweils sieben kleinere Fragmente mit Längen von 5.0 kb, 3.6 kb, 2.9 kb, 2.1 kb, 1.6 kb, 0.96 kb und 0.78 kb entstanden sind.

Durch Southernanalyse wurde bei allen Klonen die Homologie von jeweils einem klonierten Fragment zur piti cDNA bestätigt (Tab. V).

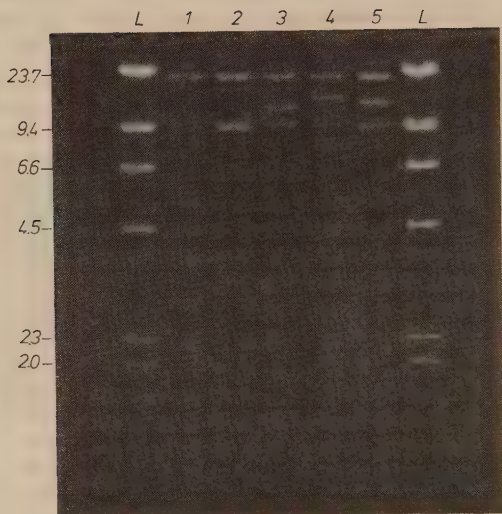


Abb. 11. Restriktionsanalyse der phi Phagenklone A1-A5.

Die Phagen DNA von A1-A5 (Spur 1-5) wurde mit der Restriktionsendonuklease EcoRI gespalten und auf einem 0.4% igem Agarosegel aufgetrennt. Als Längenstandard diente HindIII verdaute Lambda DNA (Spur L). Die Fragmentgrößen sind in kb angegeben.

Tab. V. Anzahl und Größe der klonierten Fragmente von A1-A5 nach EcoRI Verdau. Die nach Hybridisierung mit der piti Sonde ITI- positiv reagierenden Fragmente sind unterstrichen.

Klon	Anzahl der Fragmente	Größe der Fragmente (kb)
A1	7	5.0; 3.6; 2.9; 2.1; <u>1.6</u> ; 0.96; 0.78
A2	2	<u>9.0</u> ; 3.0
A3	2	<u>11.5</u> ; 1.8
A4	1	<u>15.0</u>
A5	2	<u>13.0</u> ; 1.2

1.3.3.2 Hybridisierung von A1-A5 mit endständigen Fragmenten der piti cDNA

Zur Lokalisation der genomischen 5'- und 3'-Sequenzen auf den Klonen A1-A5 wurden endständige DNA Fragmente als Sonden hergestellt. Da die Spaltstellen der Enzyme der piti cDNA bekannt waren, konnten die Enzyme so gewählt werden, daß möglichst kleine (maximal 300 bp) für die Hybridisierung geeignete Fragmente erzeugt wurden. Die Länge dieser Fragmente (Sonden) erlaubte weiterhin die Einhaltung stringenter Waschbedingungen, so daß die Hybridisierungssignale eindeutig zugeordnet werden konnten. Dazu wurde piti Plasmid DNA mit der Restriktionsendonuklease EcoRI verdaut (Herausschneiden des Inserts). Durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen ClaI sowie ApaLI wurden zusätzlich die randständigen Fragmente von 157 bp am 5' Ende (ClaI) bzw. 292 bp am 3' Ende (ApaLI) entfernt (Abb. 12) und nach Auftrennung über ein Agarosegel (1.2%) über DE 81 Cellulosepapier isoliert.

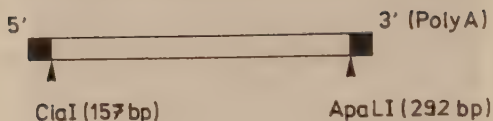


Abb. 12. Vereinfachte Darstellung des Partialklons der piti cDNA.

Durch Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen ClaI (5' Ende) und ApaLI (3' Ende) wurden endständige piti cDNA Sonden erzeugt.

Phagen DNA von A1-A5 wurde nach SalI-Verdau und Agarosegelelektrophorese auf zwei Nitrocellulosefilter identisch übertragen und nach Southerntransfer parallel mit jeweils einem der beiden mit ^{32}P markierten randständigen Fragmente hybridisiert (Tab. VI). Die Autoradiogramme (Abb. 13) lassen mit einer Ausnahme (A1) bei allen Klonen jeweils ein Fragment erkennen, welches mit beiden Sonden hybridisiert. Dies bedeutet, daß die Klone A2-A5 auf diesem Fragment sowohl zum 5' als auch zum 3' Ende des Partialklons der piti cDNA homologe Sequenzen tragen. A1 ist mit großer Wahrscheinlichkeit ein genomischer Partialklon. Er trägt ausschließlich zum 3' Ende der mRNA komplementäre Sequenzen. Das schwache Signal mit der 5' endständigen ClaI Sonde ist als Artefakt infolge sehr langer Expositionsdauer zu betrachten. Es ist deutlich schwächer als die Signale bei den übrigen Klonen (Abb. 13).

Tab. VI. Southernanalyse von A1-A5 Phagen DNA mit endständigen Fragmenten der piti cDNA nach Spaltung mit EcoRI.

Klone	Hybridisierung mit der	
	ClaI Sonde (5' Ende)	ApaLI Sonde (3' Ende)
A1	(+)	+++
A2	++	+++
A3	+	+
A4	+	+
A5	++	+

((+)) sehr schwach, (+) schwach, (++) mittel und (+++) starkes Hybridisierungssignal

Die Länge des hybridisierenden Fragmentes von A1 beträgt 1.6 kb. Die Längen der klonierten Fragmente von A2-A5, die jeweils zu beiden randständigen Sonden hybridisieren, betragen 9 kb (A2), 11.5 kb (A3), 15 kb (A4) und 13 kb (A5). Da die Länge der cDNA nur 2.26 kb mißt, lassen diese Längen auf Intronbereiche schließen, deren Länge die der Exons um ein Vielfaches übertrifft.

Die bei den Klonen A1 und A2 nach Hybridisierung mit der ApaLI-Sonde (292 bp, 3' Ende) deutlich stärker als bei den übrigen Klonen (A3, A4 und A5) auftretenden Signale (Abb. 13 linkes Bild und Tab.VI), lassen den Schluß zu, daß der zur piti cDNA homologe klonierte Bereich auf A1 und A2 größer als bei den übrigen Klonen ist.

Bei Hybridisierung mit der ClaI-Sonde (157 bp, 5' Ende) reagieren die Klone A3 und A4 schwächer als A2 und A5 (Abb. 13 linkes Bild). Man könnte hieraus folgern, daß entweder der bei diesen Klonen zur ClaI-Sonde homologe Bereich kürzer ist, oder daß bei diesen Klonen eine geringere DNA Menge untersucht wurde (Abb. 11).

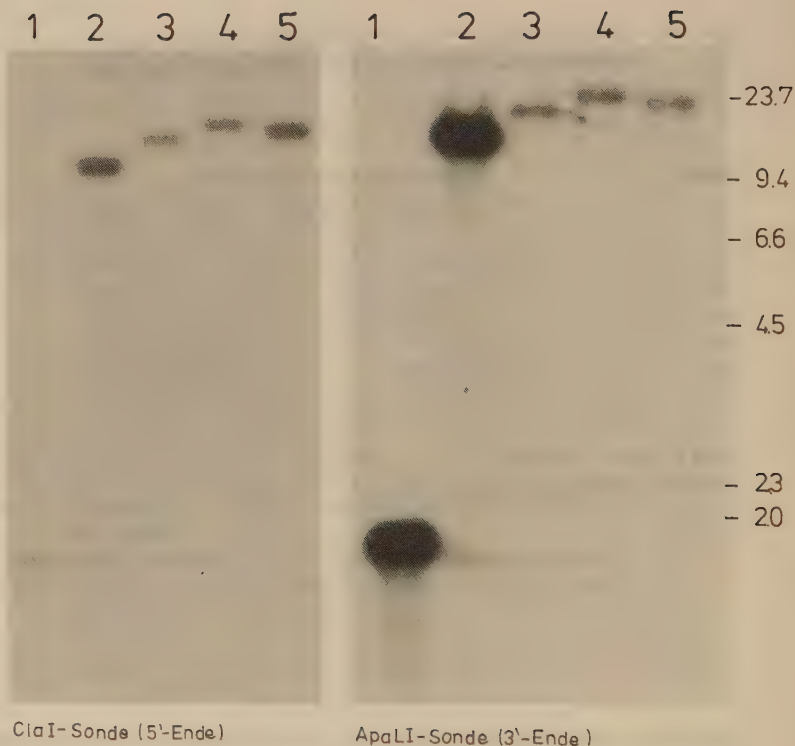


Abb. 13. Southernanalyse von A1-A5 Phagen DNA mit randständigen Fragmenten der piti cDNA nach EcoRI Verdau.

Phagen DNA von A1-A5 (Spur 1-5) wurde mit EcoRI geschnitten (E 2.3), gelelektrophoretisch aufgetrennt (0.4% Agarose, E 2.4) und nach Transfer auf Nitrocellulosefilter (E 2.6) mit randständigen Sonden der piti cDNA hybridisiert (E 2.7.2).

Linkes Bild. Hybridisierung mit der ClaI-Sonde (5'-Ende).

Rechtes Bild. Hybridisierung mit der ApaLI-Sonde (3'-Ende).

Als Längenstandard diente Lambda DNA mit HindIII geschnitten.

1.3.4 Zwischenzusammenfassung

1. Die Southernanalyse mit Leukozyten DNA läßt keine eindeutige Aussage zu über Anzahl und Größe des(r) piti H-Ketten Gens(e) im Genom. Sie läßt ein, zwei oder vier Gene in Frage kommen.

2. Durch die ausgewählte Klonierungsstrategie konnten genomische piti spezifische Sequenzen kloniert werden. Die klonierten Fragmente von A1-A5 tragen mit einer Ausnahme sowohl zum 5'- als auch zum 3' Ende des piti cDNA Partialklons homologe Bereiche.

3. Die Größen der mit beiden Sonden hybridisierenden Banden (9 kb, 12 kb, 13 kb, 15 kb) lassen auf lange Intronsequenzen im H-Ketten Gen schließen.

2 Untersuchung der piti Phagenklone auf homologe DNA Bereiche

Um überlappende DNA Bereiche der klonierten genomischen Fragmente innerhalb der H-Ketten (piti) Klone aufzuzeigen, wurde die Phagen DNA dieser Klone durch Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und Southern-Blot-Analyse charakterisiert. Als Sonde diente die das 3' Ende enthaltende piti cDNA (Partialklon C 1.2) mit einer Länge von 2260 bp.

2.1 Überlappende DNA Bereiche von A1-A5 (H-Kette)

Die Phagen DNA von A1-A5 wurde mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI, BamHI, HindIII, XbaI, SstI, HindII, SphI, KpnI, ClaI und PstI geschnitten und anschließend gelelektrophoretisch (0.5% und 1.2% Agarose) untersucht. Die Länge der entstandenen Fragmente wurde anhand der Größe von Markerbanden abgeschätzt (Abb. 14). Durch Doppelverdau mit den oben genannten Restriktionsenzymen konnte die Reihenfolge der gebildeten Spaltprodukte eindeutig festgelegt werden.

Durch Southernanalyse mit der piti cDNA Sonde wurden die hybridisierenden Bereiche bestimmt (Abb. 15).

Zunächst wurden von allen Klonen (A1-A5) Restriktionskarten erstellt (Abb. 16), die über die Größe des klonierten Fragmentes, die Reihenfolge der Schnittstellen der Restriktionsenzyme (BamHI, EcoRI, HindIII, XbaI) darauf sowie über die Länge des hybridisierenden Bereiches Aufschluß ergaben. Die Anzahl der Fragmente nach Spaltung mit den übrigen Restriktionsendonukleasen (SstI, HindII, SphI, KpnI, ClaI, PstI) war bei einigen Klonen sehr hoch (Tab. VII und Abb. 14). Dadurch war es bei keinem dieser Enzyme möglich, die Positionen ihrer Schnittstellen bei allen Klonen völlig eindeutig und zweifelsfrei festzulegen. Die Schnittstellen dieser Enzyme konnten deshalb nicht exakt kartiert werden. Der Nachweis dieser Spaltstellen würde allerdings die Zuordnung von zu sequenzierenden DNA Fragmenten wesentlich erleichtern.

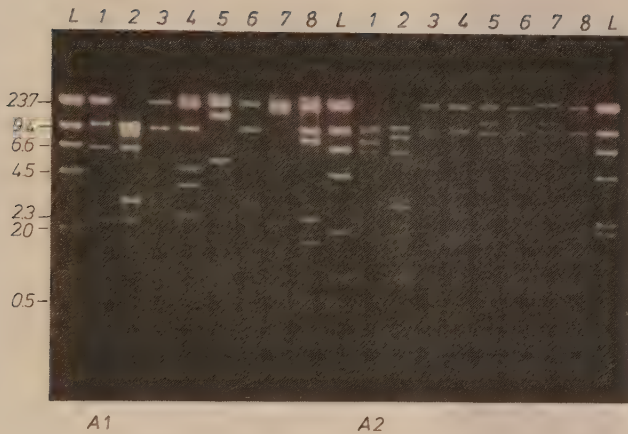


Abb. 14. Restriktionsanalyse von A1 und A2

Die Phagen DNA von A1 und A2 wurde durch Spaltung mit verschiedenen Restriktionsenzymen untersucht: SphI (Spur 1), SphI und EcoRI (Spur 2), EcoRI (Spur 3), SstI (Spur 4), SstI und EcoRI (Spur 5), EcoRI (Spur 6), XbaI (Spur 7), XbaI und EcoRI (Spur 8) und auf einem 0.5% Agarosegel aufgetrennt. Als Längenstandard diente Lambda DNA mit HindIII geschnitten (Spur L). Die Fragmentgrößen sind in kb angegeben.

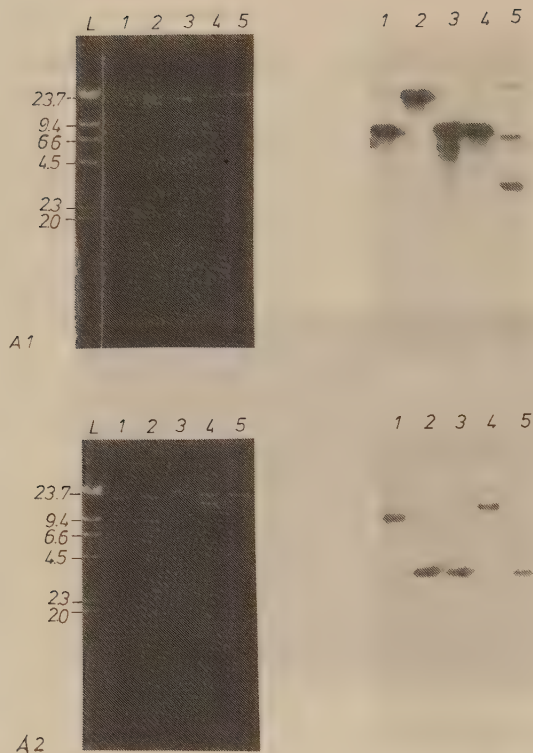


Abb. 15. Restriktionskartierung von A1 und A2

Von den Restriktionsanalysen der Phagenklone A1 (oben) und A2 (unten) sind jeweils das Agarosegel und die Autoradiographie der Southernanalyse, bei der ^{32}P markierte piti cDNA als Sonde (C 1.1) diente, gezeigt. Die Auftrennung der Spaltansätze erfolgte über ein 0.4% Agarosegel (links). Als Längenstandard diente Lambda DNA mit HindIII geschnitten (Spur L). Die Phagen DNA wurde jeweils mit EcoRI (Spur 1), EcoRI und BamHI (Spur 2), HindIII (Spur 3), HindIII und BamHI (Spur 4) und BamHI (Spur 5) geschnitten.

Tab. VII. Restriktionsschnittstellen von A1-A5.

Enzym	A1	A2	A3	A4	A5
-------	----	----	----	----	----

a.) gefunden/zugeordnet

BamHI	1/1	1/1	2/2	2/2	2/2
EcoRI	8/3	3/3	3/3	2/2	3/3
HindIII	10/2	5/5	3/3	4/4	2/2
XbaI	3/2	2/2	5/5	4/4	4/4

b.) gefunden, aber nicht eindeutig zuordbar

SstI	4	3	0	2	0
HindII	13	10	12	12	12
SphI	7	3	4	4	3
KpnI	3	2	2	2	3
ClaI	5	6	5	5	6
PstI	8	5	8	8	5

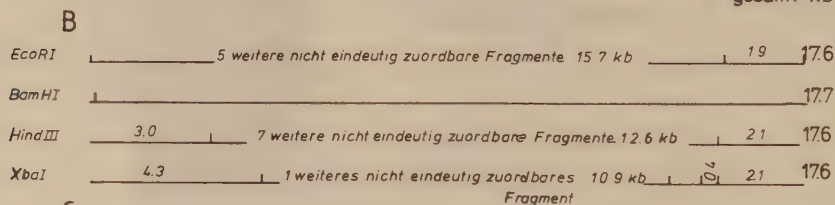
Abb. 16. Restriktionskarten der Klone A1-A5.

A Längenangabe (kb) in Skalenteilen.

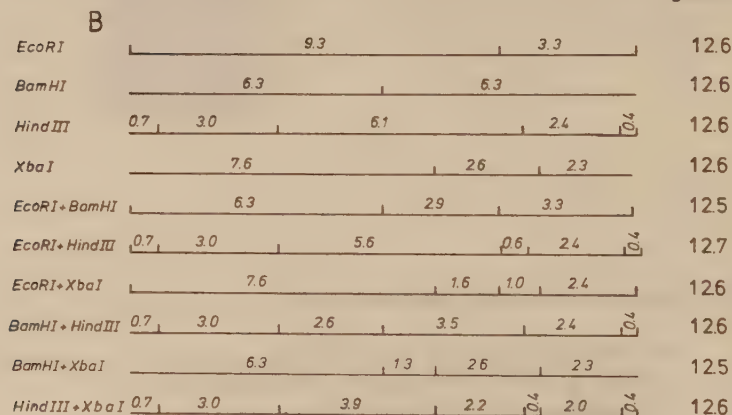
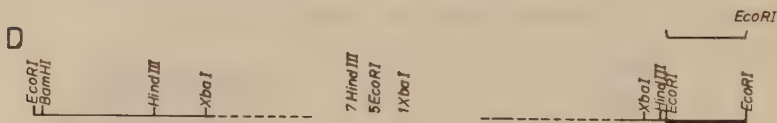
In B sind die Größen der nach Restriktionsverdau entstandenen Fragmente angezeigt.

C stellt die mit der piti Sonde hybridisierenden Fragmente dar.

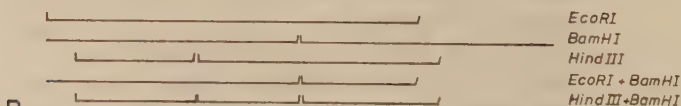
Darunter (D) liegt die Restriktionskarte, wobei der dicke Balken H-Ketten DNA, der leere Balken Intronsequenzen und der dünne Strich humaner ITI unspezifischer DNA entspricht.



C

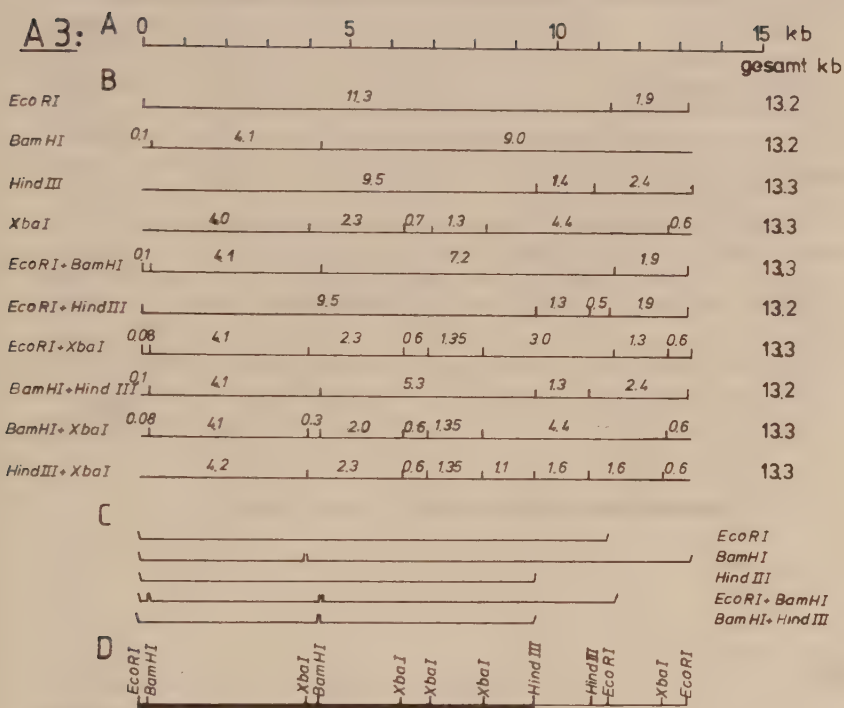


C

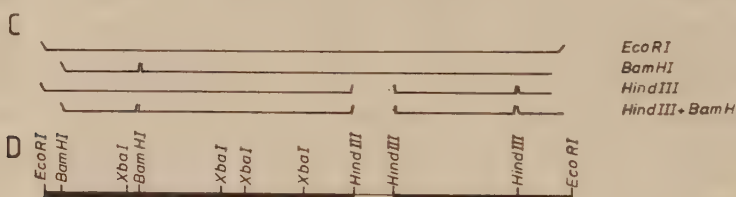
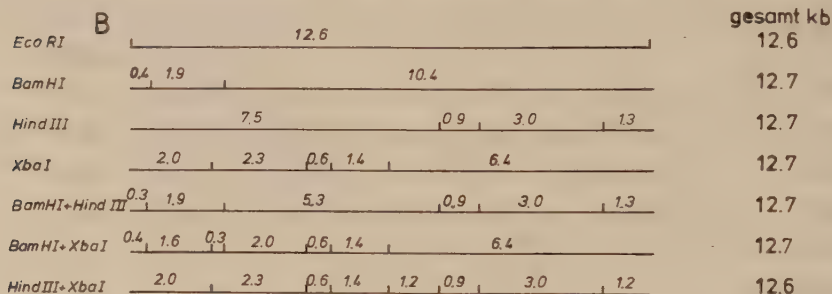


D

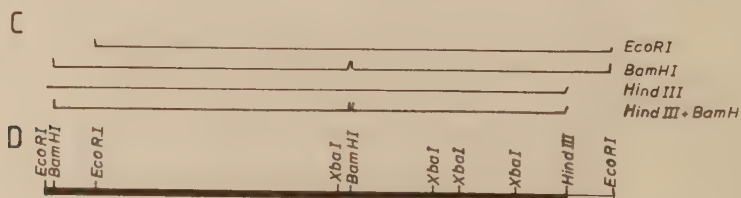
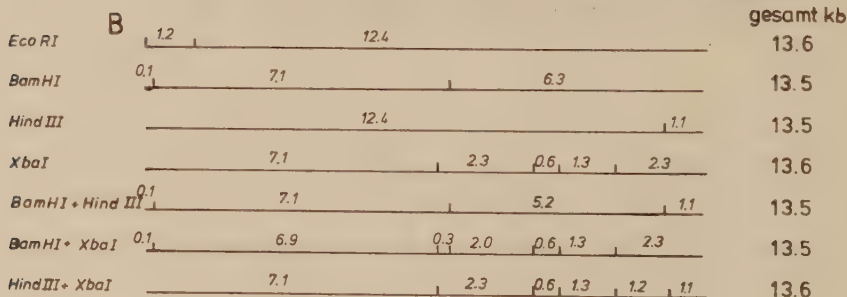




A4: A 0 5 10 15 kb



A5: A 0 5 10 15 kb



Wie in Abb. 17 zu erkennen ist, konnten alle Klone A1-A5 aufgrund von Homologien im Spaltmuster und im hybridisierenden Bereich einander zugeordnet werden. Die Überlappungen zwischen A1 und A2 beschränken sich auf ein gemeinsames hybridisierendes 1.6 kb EcoRI Fragment (Tab. VIII). In der rechtsseitig davon flankierenden ITI unspezifischen Region beider Klone befinden sich eng benachbarte Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI, HindIII und XbaI. Die Länge des klonierten Fragmentes von A1 beträgt 17.7 kb. Hierauf waren insgesamt 7 Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease EcoRI und 9 Schnittstellen für das Enzym HindIII verstreut. Die Anordnung dieser Spaltstellen konnte mit einer Ausnahme (1.6 kb hybridisierendes EcoRI Fragment) nicht festgelegt werden (Abb. 14). Das klonierte ITI spezifische Fragment von A1 hat eine Länge von 1.6 kb (Pos. 19.7-21.3), das von A2 eine Länge von 8.5 kb (Pos. 12.8-21.3).

Tab. VIII. Länge und Positionen klonierter, ITI spezifischer Sequenzen von A1-A5 nach Restriktionsanalyse mit EcoRI, BamHI, HindIII und XbaI und Hybridisierung mit der H-Ketten Sonde

Klon	Länge der Fragmente (kb)	Positionen der Fragmente (SKT)
A1	1.6	19.7-21.3
A2	8.5	12.8-21.3
A3	9.6	3.1-12.8
A4	11.8	5.2-17.0
A5	13.4	0.1-13.5

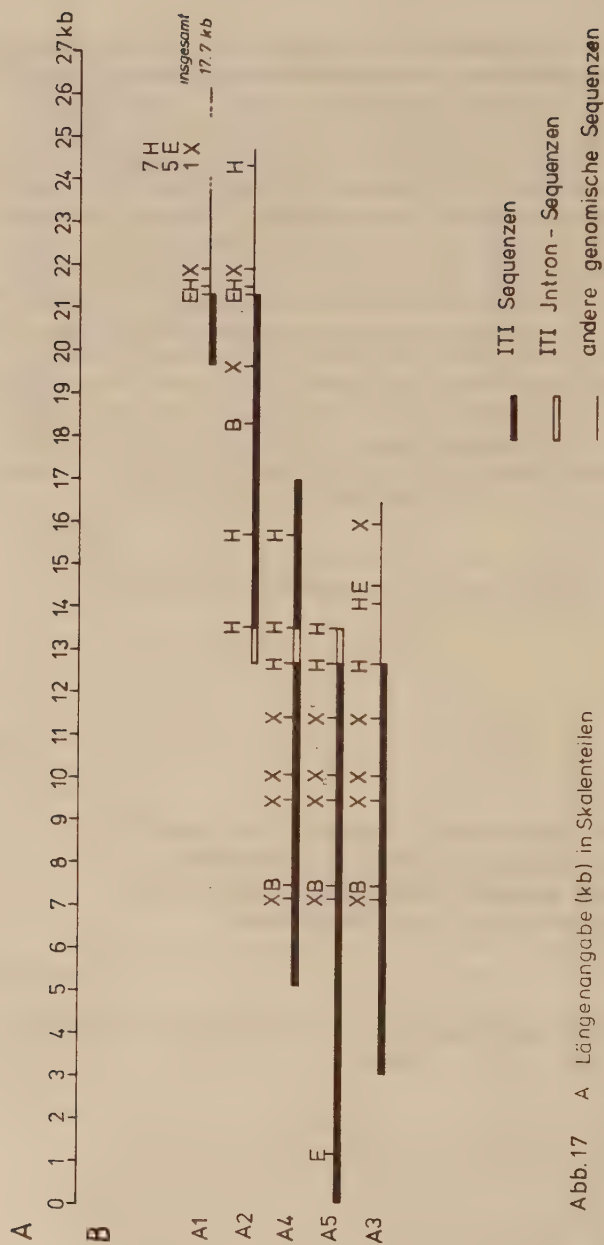


Abb. 17 A Längenangabe (kb) in Skalenteilen
B Darstellung homologer DNA Bereiche zwischen den piti Klonen A1-A5

E = EcoRI, B = BamHI, H = HindIII, X = XbaI

A2 und A4 überlappen über einen sequenzhomologen Bereich von 4.2 kb. Hierauf befindet sich ein von HindIII Spaltstellen flankiertes Intron von 0.7 kb (Pos. 12.8-13.5). Das Fragment ist bei der Southernanalyse von genomischer Leukozyten DNA mit der cDNA als Sonde nicht zu sehen. Dasselbe Fragment zeigt ebenso bei der Restriktionsanalyse der Phagen DNA mit HindIII und anschließender Hybridisierung mit der piti cDNA keine Reaktion. Die ITI spezifische Region von A4 beträgt 11.8 kb (Pos. 5.2-17.0). A4 und A5 tragen ausschließlich ITI positive Sequenzen. A3, A4 und A5 besitzen einen gemeinsamen überlappenden Bereich von 8.6 kb, auf dem sich charakteristische Spaltstellen für das Restriktionsenzym XbaI (Pos. 7.2; 9.5; 10.1; 11.4) befinden. Der den Klonen A4 und A5 gemeinsame Bereich beträgt hierbei 8.3 kb, der von A3 und A5 10.4 kb. Die ITI sequenzhomologe Region von A5 ist am längsten, sie beträgt 13.4 kb (Pos. 0.1-13.5). Der ITI positiv reagierende Abschnitt von A3 erstreckt sich von Position 3.1-12.8 (HindIII Spaltstelle). In den rechtsseitig daran anschließenden Sequenzen befinden sich Spaltstellen für HindIII (Pos. 14.1), EcoRI (Pos. 14.6) und XbaI (Pos. 16.0), die in den entsprechenden Positionen der übrigen Klone nicht gefunden werden. Sowohl bei der Southernanalyse von genomischer DNA mit der piti cDNA als auch bei der Restriktionsanalyse der Phagen DNA von A3 mit verschiedenen Enzymen und anschließender Hybridisierung mit der piti cDNA wurden keine weiteren hybridisierenden Fragmente bei A3 gefunden. Da der entsprechende homologe Sequenzabschnitt bei A2 und A4 ITI positiv reagiert, könnten bei A3 in Position 12.8 (HindIII Spaltstelle) andere genomische DNA Fragmente durch Rearrangements angegliedert worden sein. Eine genaue Analyse ist jedoch nur durch Sequenzierung dieses DNA Abschnittes möglich.

Insgesamt wurden 37.3 kb humane genomische DNA Sequenzen kloniert. In den klonierten ITI-Sequenzen beträgt die Anzahl der Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen wie nachfolgend aufgeführt: für XbaI existieren fünf, für HindIII drei, für BamHI zwei und für EcoRI eine Spaltstelle. Da in der piti cDNA (Sonde) für die Restriktionsendonuklease HindIII keine (Abb. 5) sowie für BamHI und EcoRI jeweils eine Spaltstelle existiert, müssen alle Schnittstellen, die in den zur piti-mRNA komplementären genomischen Sequenzen, aber nicht in der piti cDNA gefun-

den werden, in nicht kodierenden Regionen des Gens liegen.

2.1.1 Vergleich der Ergebnisse der Restriktionskarten von A1-A5 (Abb. 17) mit den Ergebnissen der Hybridisierung mit endständigen Fragmenten der piti cDNA in C 1.3.3.2 (Tab. VI)

Da die Phagen DNA von A1 nur mit der ApaLI Sonde (292 bp vom 3' der piti cDNA) und nicht mit der ClaI Sonde (157 bp vom 5' Ende) hybridisiert (Abb. 13 und Tab. VI), kann das 3' Ende des H-Ketten Gens auf diese DNA Sequenzen festgelegt werden (Pos. 21.3). A1 und A2 besitzen entsprechend den Hybridisierungssignalen (Abb. 13) und den Ergebnissen der Restriktionskartierung (Abb. 17) als einzige das vollständige 3' Ende dieses Gens.

A3, A4 und A5 hybridisieren trotz kürzerer und unterschiedlich langer 3' Enden (A4: Pos. 17.0; A5: 13.5; A3: Pos. 12.7) alle in gleichem Ausmaß mit der ApaLI Sonde, wenn auch deutlich schwächer als A1 und A2. Da die gesamte cDNA Länge nur 2.26 kb beträgt, läßt dieses Ergebnis den Schluß zu, daß die ITI-Exonsequenzen sehr stark von Introns unterbrochen sein müssen und dadurch verstreut vorliegen.

Obwohl auch die 5' Enden der Klone A2 (Pos. 12.7), A4 (Pos. 5.2), A5 (Pos. 0.1) und A3 (Pos. 3.1) unterschiedlich lang sind, zeigen doch mit Ausnahme von A1 alle Klone mit der ClaI Sonde eine positive Hybridisierungsreaktion (Abb. 13). Dieses Ergebnis bestätigt die oben gemachte Annahme, daß die ITI spezifischen Sequenzen von nicht kodierenden DNA-Abschnitten unterbrochen werden. Die unterschiedlich starken Hybridisierungsergebnisse bei diesen Klonen (Tab. VI) mit der ClaI Sonde stimmen nicht mit deren 5' Genendlängen überein (Abb. 17). Die schwächeren Hybridisierungssignale von A3 und A4 können möglicherweise auf einen schlechteren Transfer der untersuchten DNA Mengen bei diesen Klonen zurückgeführt werden.

2.1.2 Vergleich der Restriktionskartierungsdaten von A1-A5 (Abb. 17) mit den Ergebnissen der Southernanalyse von genomischer DNA mit der piti cDNA Sonde in C 1.2 (Abb. 3)

Die nach EcoRI Verdau im Southern Blot erscheinende 20 kb Bande (Abb. 4) entspricht der gesamten Länge des klonierten EcoRI Bereiches von Pos. 1.3-21.3 (Abb. 17). Die beiden zusätzlichen im Southern Blot zu sehenden EcoRI Fragmente von 6.5 kb und 1.5 kb, müssen deshalb außerhalb des klonierten Bereiches am 5' Ende des Gens liegen. Da das 1.5 kb Fragment auch nach 24h nur eine sehr schwache Reaktion zeigt, ist anzunehmen, daß auf diesem Fragment ein größerer Intronabschnitt liegt. Das 5' Genende liegt damit bei -5.7 SKT. Die Länge des H-Kettengens beträgt somit 27 kb.

Die auf den klonierten Fragmenten in Abb. 17 existierenden beiden BamHI Schnittstellen (Pos. 7.5; 18.3) umfassen ein 11 kb Fragment. Es stimmt bezüglich seiner Größe mit der im Southernblot in C 1.2 (Abb. 3) sehr stark hybridisierenden Bande überein. Da sich der hybridisierende Bereich außerhalb dieser beiden BamHI Schnittstellen in 5' Richtung um mindestens 7.5 kb fortsetzt (Abb. 17), muß es sich im Southernblot um eine Doppelbande handeln. Da sich der ITI spezifische Bereich rechtsseitig der BamHI Spaltstelle an Pos. 18.3 ebenso in 3' Richtung fortsetzt (bis Pos. 21.3) und da aber bei der Southernanalyse nach BamHI Verdau keine weiteren hybridisierenden Banden mehr gesehen werden, kann man folgern, daß die Größe dieses zusätzlichen ITI positiven Bereiches (3.0 kb) gegenüber der Länge des gesamten BamHI Fragmentes in 3' Richtung zu kurz ist (mindestens 20.7 kb), um ein signifikantes Hybridisierungssignal zu erzeugen. Unter Berücksichtigung der Genlänge von 27 kb kann diesselbe Annahme für ein am 5' Ende anschließendes noch fehlendes BamHI Fragment von 2.0 kb gemacht werden.

Bezüglich der in der Southernanalyse detektierten-HindIII Banden von 11.0 kb, 6.0 kb und 2.0 kb kann man sagen: Die klonierten und hybridisierenden Fragmente von 6.0 kb und 2.0 kb stimmen mit den Ergebnissen der Southernanalyse überein. An diese schließen in 5' Richtung die Sequenzen des kleinen 0.7 kb HindIII Fragmentes (Pos. 12.8-13.5) an, welche im Intronbereich liegen, sowie das 11 kb Fragment. Da das 5' Genende durch die EcoRI Banden auf die Pos. -5.7 festgelegt ist, muß außer dem

11.0 kb Fragment noch ein zusätzlicher von HindIII-Schnittstellen flankierter Bereich von 8.0 kb existieren. Da die Sequenzen ebenfalls bei der Southernanalyse nicht zu sehen sind, muß es sich um nicht kodierende DNA Abschnitte handeln.

2.2 Zwischenzusammenfassung

1. Durch die Klonierung wurden 21.3 kb des H-Ketten Gens erfaßt. Dieser Bereich enthält lediglich das 3' Ende.
2. Die Länge des piti H-Ketten Gens beträgt ca. 27 kb.
3. Die zur piti cDNA homologen genomischen Fragmente kodieren für nur ein piti-H-Ketten Gen im menschlichen Genom.

3 Voruntersuchungen mit der L-Ketten cDNA Sonde (miciti)

Nach Isolierung und Charakterisierung der *piti* Klon aus der EMBL4 Genbank war ein weiterer cDNA Klon durch Screenen einer humanen Leber-cDNA-Expressionsbibliothek mit Antikörpern gegen humanen ITI (*miciti*) isoliert worden, der für die inhibitorischen Domänen des Inter- α -Trypsininhibitors kodiert (Abb. 18). Er ist ebenfalls ein Partialklon, umfaßt 952 Nukleotide und enthält das 3' Ende der zur cDNA komplementären mRNA, nicht jedoch das 5' Ende. Er kodiert für die leichte Kette des Inter- α -Trypsininhibitors. Durch partielle Bestimmung der Aminosäuresequenzen von aus Serum isoliertem ITI konnten ebenfalls große Teile der von der *miciti* cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenzen, wie es auch bei der *piti* cDNA möglich gewesen war, bestätigt werden. Die komplette cDNA Sequenz (1221 bp) ist von Kaumeyer *et al.* (1987) veröffentlicht worden. Die Aminosäuresequenzen des *piti* Klones zeigten keine Homologien zu dem Sequenzbereich der für die inhibitorischen Domänen des ITI Moleküls kodiert, was dafür spricht, daß die Sequenzen für ein anderes Protein kodieren.

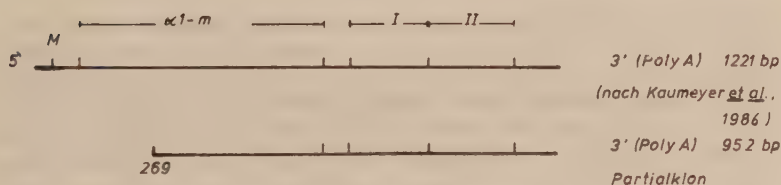


Abb. 18. Vereinfachte Darstellung des *miciti* cDNA Klones

- M: Methionin, erste Aminosäure des offenen Leserahmens
 α_1-m : α_1 -Mikroglobulinkomponente
 I, II: Kunitz-Typ Domänen I und II

3.1 Präparation der miciti cDNA Sonde

Die miciti cDNA war über die EcoRI Spaltstelle in das Plasmid pTZ 19R subkloniert. Sie wurde nach Transformation kompetenter JM83 Bakterien und präparativer Plasmidanzucht über einen Cäsiumchlorid-Gradienten gereinigt und durch Elektroelution isoliert (952 bp).

3.2 Untersuchung der H-Ketten cDNA (piti) auf homologe DNA Bereiche mit der L-Ketten cDNA (miciti)

Da zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht geklärt war, ob die pitit cDNA DNA-Bereiche enthielt, die homolog zur miciti DNA war, wurden die beiden DNA Fragmente nach Entfernung des 3' Poly A Endes des Plasmidklones miciti gegeneinander hybridisiert. Hierbei wurden keine hybridisierenden Sequenzen gefunden (ohne Abb.).

3.3 Untersuchung der Phagenklone A1-A5 auf homologe DNA Bereiche mit der miciti cDNA

Um herauszufinden, ob pitit und miciti Sequenzen auf denselben oder verschiedenen genomischen Abschnitten liegen, wurde die Phagen DNA von A1-A5 nach Restriktionsanalyse mit BamHI, EcoRI und HindIII und Southerntransfer mit der ³²P markierten miciti Insert DNA hybridisiert. Die genomischen DNA Fragmente von A1-A5, die mit der pitit cDNA hybridisierten, ließen hierbei keine positiven Signale mit der miciti cDNA erkennen (ohne Abb.). Dies spricht dafür, daß die klonierten Fragmente von A1-A5 keine gemeinsamen Sequenzen mit den genomischen miciti Sequenzen besitzen. Eine eindeutige Aussage ist jedoch nur dann möglich, wenn die vollständige genomische H-Ketten Gensequenz gegen die komplette cDNA Sequenz der L-Kette hybridisiert wird.

4 Nachweis und Identifizierung von ITI-L-Ketten spezifischen Sequenzen im Genom durch Hybridisierung mit der miciti cDNA

4.1 Southernanalyse von genomischer DNA mit der miciti cDNA

Zur Bestimmung von Größe und Anzahl der L-Ketten Gene im Genom wurde eine Southernanalyse von genomischer Leukozyten DNA mit der miciti cDNA durchgeführt. Abb. 19 zeigt einen Vergleich von zwei Autoradiogrammen desselben Nitrocellulosefilters nach unterschiedlichen Expositionszeiten (2h und 20h).

Nach 2 stündiger Exposition war bei allen getesteten Enzymen mehrere schwach hybridisierende Banden zu sehen. Nach BamHI Verdau konnte man zwei (7.5 kb und 6.0 kb), nach EcoRI Verdau vier (7.0 kb, 3.0 kb, 0.9 kb, 0.8 kb) und nach HindIII Verdau zwei Banden (bei 20 kb und 3.8 kb) erkennen (Tab.IX).

Nach 20 stündiger Exposition waren keine zusätzlichen hybridisierenden Fragmente zu beobachten.

Tab. IX. Anzahl und Größe der hybridisierenden Fragmente nach Southernanalyse von genomischer DNA mit der miciti cDNA nach 20h Exposition.

Enzym	Anzahl der Banden	Größe der Banden
		(kb)
BamHI	2	7.5; 6.0
EcoRI	4	7.0; 3.0; 0.9; 0.8
HindIII	2	20.0; 3.8

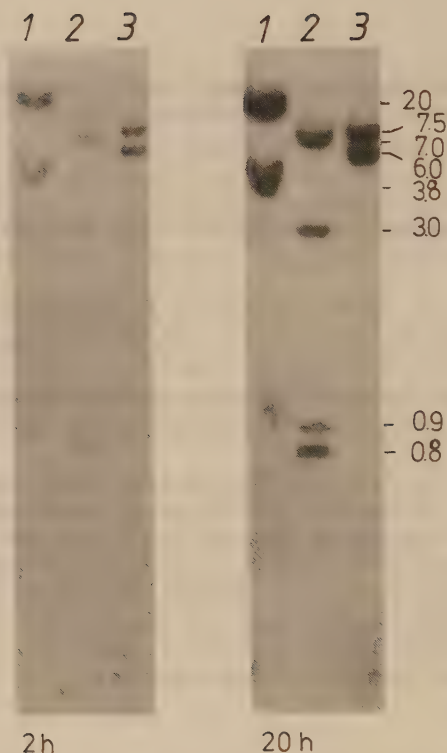


Abb. 19. Southernanalyse von genomischer DNA mit der miciti cDNA.

Humane Leukozyten DNA wurde mit der Restriktionsendonuklease HindIII (Spur 1), EcoRI (Spur 2) und BamHI (Spur 3) geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt (0.8% Agarose), auf einen Nitrocellulosefilter übertragen (E 2.6) und gegen die für die inhibitorischen Domänen des Inter-alpha-Trypsininhibitors kodierende miciti Sonde (C 2.1) hybridisiert (E 2.7.2). Die Filme wurden über 2h und über 20h exponiert. Die Fragmentgrößen sind in kb angegeben.

Da in der miciti cDNA für die Restriktionsendonukleasen BamHI, EcoRI und HindIII keine Spaltstellen existieren (Kaumeyer et al., 1987), müssen diese Enzyme entweder außerhalb des sequenzierten Bereiches oder in Regionen zwischen den Genen schneiden.

Für die genomische Organisation des L-Ketten Gens waren somit folgende Möglichkeiten denkbar (Schemazeichnungen Abb. 20 A,B,C):

(a) Ein Gen (Abb. 20A)

Die Restriktionsendonukleasen BamHI (B) und HindIII (H) spalten je einmal im Gen. Die Lage ihrer Spaltstellen im Gen ist von der Entfernung zu ihren Schnittstellen in den benachbarten genomischen Regionen abhängig.

Die Positionen der EcoRI (E) Spaltstellen sind durch die Größen der entstehenden Fragmente (7.0 kb, 3.0 kb, 0.9 kb, 0.8 kb) fixiert. Sie liegen entweder alle im Gen oder die in der Mitte liegenden EcoRI Spaltstellen befinden sich im Gen und die jeweils am weitesten außen liegenden EcoRI Schnittstellen befinden sich in anderen genomischen und flankierenden Regionen (mögliche Positionen für die äußersten EcoRI Spaltstellen mit 1 oder 2 bezeichnet).

(b) Zwei Gene (Abb. 20B)

Die Restriktionsendonukleasen BamHI, HindIII und EcoRI schneiden je einmal zwischen den beiden Genen: entweder in den Zwischengenabschnitten (Pos. 2) oder in den Intronsequenzen von Gen 1 und Gen 2 (mögliche Positionen mit 1 oder 3 bezeichnet).

Möglichkeit 1

EcoRI schneidet zusätzlich noch jeweils zweimal am äußeren Rande der beiden Gene entweder ausschließlich im Gen oder jeweils einmal im Gen und einmal in den flankierenden humanen Sequenzen (mögliche Positionen für die am weitesten außen liegenden EcoRI Spaltstellen mit 1 oder 2 bezeichnet).

Möglichkeit 2

Alle EcoRI Stellen liegen in einem der beiden Gene oder zwei EcoRI Spaltstellen liegen in einem der beiden Gene und eine in den flankierenden Sequenzen dieses Gens (mögliche Positionen mit 1 oder 2 bezeichnet).

(c) Drei Gene (Abb. 20C)

Die Restriktionsenzyme BamHI, HindIII und EcoRI schneiden je einmal zwischen den Genen: entweder in den Zwischen-genabschnitten (Pos. 2) oder in den nicht kodierenden Abschnitten dieser Gene (mögliche Positionen mit 1 oder 3 bezeichnet).

Möglichkeit 1

Es existiert ein Gen, welches keine Spaltstelle für die Restriktionsendonuklease EcoRI besitzt (weiterhin Erläuterung wie zu Abb. 20B Möglichkeit 1).

Möglichkeit 2

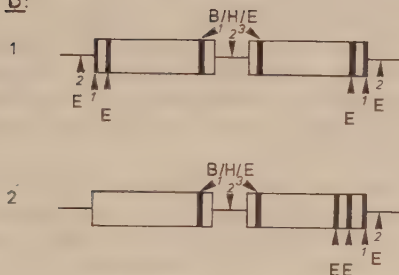
Es gibt zwei Gene, in denen keine Spaltstelle für die Restriktionsendonuklease EcoRI existiert (weiterhin Erläuterung wie zu Abb. 20B Möglichkeit 2).

Durch die Southernanalyse von Leukozyten DNA mit der miciti cDNA kann keine eindeutige Aussage über die im Genom vorhandene Anzahl an L-Ketten Genen und deren Größe gemacht werden. Es können ein, zwei oder drei Gene existieren.

A:



B:



C:

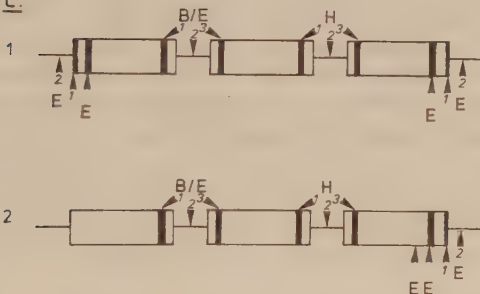


Abb. 20. Erklärungsmodelle für die Southernanalyse von Leukozyten DNA mit der miciti cDNA (Partialklon).

A: Ein Gen

B: Zwei Gene

C: Drei Gene

Schwarzer Balken: Intron

E=EcoRI, B=BamHI, H=HindIII

4.2 Klonierung

Das Screenen einer Genbank führt gleichzeitig zu einer Amplifizierung der ausplattierten Phagen. Dabei werden nicht rekombinante Phagen im Wachstum bevorzugt. Rekombinante Phagen, deren Inserts im unteren bzw. oberen Größenbereich liegen, werden unterrepräsentiert oder gehen sogar verloren. Aus diesen Gründen stellt ein erneutes Screenen einer amplifizierten Genbank (EMBL4 Genbank in C1.3.2) einen zu großen Arbeitsaufwand dar (Verlust von 50 % Alu positiven Phagen, ohne Abb.). Es wurde daher eine neue Genbank in EMBL3 analog zu den Ausführungen in E 2.12 und Abb. 7 konstruiert.

EMBL3 (Frischauf, 1983) unterscheidet sich von EMBL4 hauptsächlich darin, daß die Positionen der inneren SalI- sowie der äußeren EcoRI Spaltstelle im Polylinker vertauscht sind, d.h. BamHI als Klonierungsseite bleibt erhalten und die klonierten Insertfragmente können nun durch Verdau mit SalI isoliert werden (Abb. 21). Interne SalI Stellen existieren nicht. Da die Spaltstellen dieses Enzyms in der genomischen DNA unterrepräsentiert sind, wird bei einer Klonierung in EMBL3 die Isolierung des kompletten Insertfragmentes erleichtert.

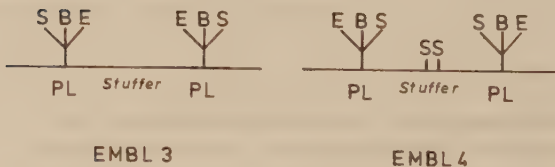


Abb. 21. Schemazeichnung Polylinker des EMBL3 und EMBL4 Phagen. Die Polylinkersequenzen unterscheiden sich lediglich in der Anordnung der Spaltstellen der für die Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme.

4.2.1 Anlegen einer Genbank im Lambda Phagen EMBL3

Da rekombinante EMBL4 Phagen nach Ausplattieren auf dem Wirtsstamm Q359 nur sehr kleine Plaques bilden, die häufig auch nach 48 stündiger Exposition nur schwache, vom Untergrund schwer unterscheidbare Signale zeigen, wurde für die Erstellung sowie das anschließende Screenen der EMBL3 Genbank der Bakterienstamm WL87 verwendet. WL87 ist im Gegensatz zu Q359 ein permissiver Wirt. Gegenüber Q358 zeichnet er sich durch eine stärkere Vermehrung und größere Plaquebildung der ausplattierten Phagen aus (Abb. 22, Bild C).

Um Klonierungsartefakten vorzubeugen, wurden dieselben Kontrollversuche wie für die Genbank in EMBL4 durchgeführt (E 2.12.6, E 2.12.3 und E 2.12.4):

- (1) Test der Wirtsstämme auf rec A^-
- (2) Test der Güte der Verpackungsextrakte (Tab. X)
- (3) Bestimmung der Verpackungseffizienz (Tab. XIa)
- (4) Größenfraktionierung der zu klonierenden Donor DNA
- (5) Nachweis klonierter eukaryontischer Sequenzen durch Hybridisierung mit Alu DNA (Tab. XIb)

Tab. X. Verpackungseffizienz von EMBL3 Vektor DNA

Vektor DNA wurde wie in E 2.12.2 beschrieben gespalten und in vitro in Phagenköpfe verpackt (E 2.12.7). Die Phagen wurden auf dem Wirtsstamm WL87 ausplattiert und die entstandenen Plaques gezählt. Die Ergebnisse wurden auf Anzahl Plaques pro μg DNA umgerechnet. Als Kontrolle dienten Verpackungsextrakte ohne DNA.

EMBL3 Vektor DNA	Plaques/ μg
unverdaut	1.5×10^9
unverdaut ligiert	1.4×10^8
BamHI verdaut	3.0×10^3
BamHI verdaut und ligiert	9.0×10^7
BamHI und EcoRI verdaut	1.7×10^3
BamHI und EcoRI verdaut und ligiert	1.7×10^3
Kontrolle (keine DNA)	0

Tab.XI

a. Verpackungseffizienz von EMBL3 DNA mit Leukozyten DNA ligiert.

EMBL3 DNA wurde mit BamHI und SalI verdaut (E 2.12.1), im angegebenen Verhältnis mit Leukozyten DNA ligiert (E 2.12.5) und anschließend auf dem Bakterienstamm WL87 ausplattiert (E 2.12.7). Als Kontrolle dienten Verpackungsextrakte ohne EMBL3 DNA.

b. Nachweis von Alu Sequenzen auf den klonierten Fragmenten der rekombinanten EMBL3 Phagen.

Phagen mit klonierter humaner Leukozyten DNA (Vektor:Insert DNA = 4:1) wurden auf dem Stamm WL87 vermehrt (E 2.12.7). Die Phagen DNA wurde auf Nitrocellulosepapier fixiert (E 3.6) und gegen eine ^{32}P markierte Alu-DNA Sonde hybridisiert (E 2.7.2). Der prozentuale Anteil positiver Signale wurde mittels der Zahl gewachsener Phagenplaques bestimmt. Als Kontrolle dienten Phagen mit unverdauter verpackter DNA.

a. Wachstum auf WL87 b. % Alu positiv

EMBL3/Leuko- zyten DNA	Plaques/ug	
5 : 1	2.3×10^6	n. d.
4 : 1	2.6×10^6	75 %
3 : 1	1.1×10^6	n. d.
2 : 1	1.0×10^6	n. d.
1 : 1	5.0×10^6	n. d.
Kontrolle	0	0

Die Extrakte enthalten keine endogene DNA (Kontrolle ohne DNA). Spaltung und Religierung der Vektorpräparationen erfolgten effizient. Nach BamHI und EcoRI Verdau erfolgte die Verpackung von lebensfähigen Phagen nur noch zu $5.6 \times 10^{-4}\%$.

Ein Ligierungsverhältnis von 4:1 (EMBL3 Vektor DNA: Leukozyten DNA = w/w) erwies sich als optimal (Tab. XIa). 75 % der auf dem Bakterienstamm WL87 ausplattierten Phagen reagierten bei der Hybridisierung mit Alu DNA positiv (Tab. XIb).

Für die Konstruktion der EMBL3 Genbank genügten 0.7 μ g humane Leukozyten DNA.

4.2.2 Screenen der EMBL3 Genbank mit der miciti cDNA Sonde

Es wurden 8×10^5 rekombinante, mit der Alu Sonde positiv reagierende Phagen ausplattiert und gegen die mit ^{32}P radioaktiv markierte miciti Sonde (C 2.1) hybridisiert. Dabei wurden 8 mit der miciti cDNA hybridisierende Klone (B1-B8) isoliert.

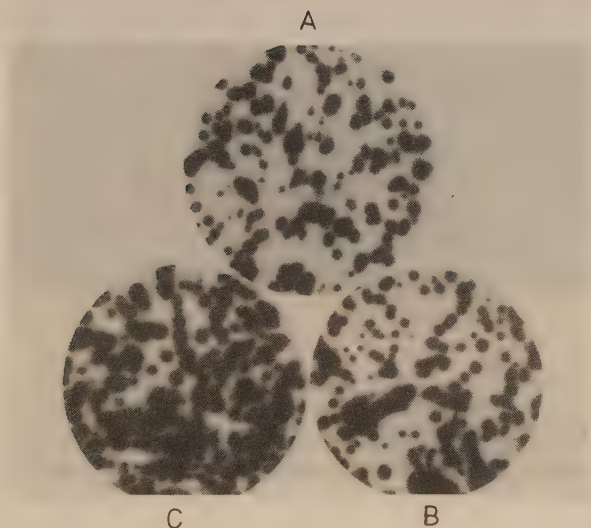


Abb. 22. Bestimmung der Vermehrungseffizienz von EMBL3 Phagen auf verschiedenen E. coli Stämmen.

Rekombinante EMBL3 Phagen wurden nach Adsorption mit den Bakterienstämmen Q358 (A), Q359 (B) und WL87 (C) auf Agarplatten ausplattiert. Nach Wachstum in bei 37°C wurde die DNA auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (E 2.6.1) und mit der ^{32}P markierten Alu-DNA hybridisiert (E 2.7.2).

4.2.3 Charakterisierung der miciti Phagenklone B1-B8

4.2.3.1 Restriktionsanalyse von B1-B8

Die positiv identifizierten Klone wurden bis zur Klonalität gereinigt, Phagenlysate hergestellt und die DNA im präparativen Maßstab isoliert. Die Agarosegelelektrophorese (0.4%) ließ erkennen, daß die zur cDNA komplementären, klonierten Insertfragmente aller rekombinanten Phagen durch SalI Verdau komplett herausgeschnitten werden konnten. Ihre Längen betrugen 16.9 kb (B1), 18.5 kb (B2), 16.1 kb (B3), 23.6 kb (B4), 12.9 (B5), 15.7 kb (B6), 13.0 (B7) und 18.5 kb (B8) (Abb. 23 und Tab. XII).

Durch Southern Blot Analyse der mit SalI gespaltenen Phagen DNA von B1-B8 mit der miciti cDNA wurde gezeigt, daß alle Fragmente mit der miciti DNA hybridisierten (ohne Abb.).

Tab. XII. Anzahl und Größe der klonierten und mit der miciti cDNA hybridisierenden Fragmente von B1-B8 nach SalI Verdau.

Klon	Anzahl der Fragmente	Größe der Fragmente (kb)
B1	1	16.9
B2	1	18.5
B3	1	16.1
B4	1	23.6
B5	1	12.9
B6	1	15.7
B7	1	13.0
B8	1	18.5

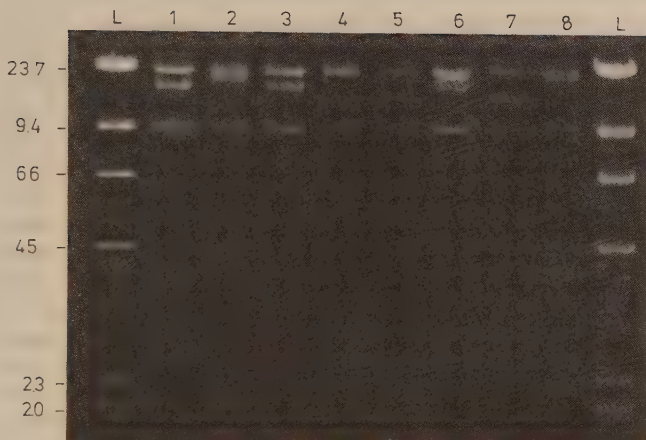


Abb. 23. Restriktionsanalyse der miciti Klone B1-B8.

Phagen DNA von B1-B8 (Spur 1-8) wurde mit der Restriktionsendonuklease Sali gespalten und auf einem 0.4% igem Agarosegel aufgetrennt. Als Längenstandard diente HindIII verdaute Lambda DNA (Spur L). Die Fragmentgrößen sind in kb angegeben.

4.2.3.2 Hybridisierung von B1-B8 mit endständigen Fragmenten der miciti cDNA

Zur Lokalisation der mit der L-Ketten Sonde hybridisierenden genomischen 5'- und 3' Sequenzen auf den Klonen B1-B8 wurden neue Sonden hergestellt, die das 5'- bzw. 3'-Ende des miciti cDNA Inserts umfassen. Dazu wurde der miciti Plasmid Klon nach EcoRI Verdau (Herausschneiden des Inserts) mit den Restriktionsendonukleasen NarI und XmnI geschnitten und die randständigen Fragmente von 240 bp am 5' Ende (NarI) bzw. 210 bp am 3' Ende (XmnI) nach Agarosegelelektrophorese (1.2%) durch Elektroelution isoliert (Abb. 24). Da die Spaltstellen der miciti cDNA bekannt waren (Kaumeyer et al., 1986), konnten auch hier die Enzyme so gewählt werden, daß möglichst kleine (maximal 300 bp) für die Hybridisierung geeignete Fragmente erzeugt wurden. Die Länge dieser Fragmente erlaubte weiterhin die Einhaltung stringenter Waschbedingungen, sodaß die Hybridisierungssignale eindeutig zugeordnet werden konnten.

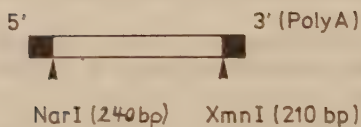


Abb. 24. Vereinfachte Darstellung des Partialklons der miciti cDNA.

Durch Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen NarI (5' Ende) und XmnI (3' Ende) wurden endständige miciti cDNA Sonden hergestellt.

Die mit der Restriktionsendonuklease SalI verdaute Phagen DNA der Klone B1-B8 wurde in zwei parallel durchgeführten Experimenten mit den isolierten, mit ^{32}P markierten randständigen Sonden hybridisiert (Abb. 25).

Wie auf den Autoradiogrammen zu sehen ist, besitzen alle Phagenklone B1-B8 Bereiche, die sowohl zum 5' als auch zum 3' Ende der miciti cDNA Homologien aufweisen. Die Intensitäten der Hybridisierungssignale mit den beiden Sonden sind jedoch bei den einzelnen Klonen unterschiedlich stark (Tab. XIII).

Nach Hybridisierung mit der NarI-Sonde (240 bp, 5' Ende) lassen die Klone B1, B3, B5 und B6 gegenüber den übrigen Klonen (B2, B4, B7, B8) deutlich stärkere Signale erkennen.

Bei Verwendung der XmnI-Sonde (210 bp, 3' Ende) sind mit Ausnahme von zwei Klonen (B5 und B6) noch stärker hybridisierende Signale zu sehen, die sich auch von denen mit der NarI-Sonde trotz gleicher Expositionszeit der Filme deutlich abheben. Das bedeutet, daß möglicherweise der DNA Transfer bei den verschiedenen Klonen nicht gleich effizient erfolgt ist. Zum andern könnten aber auch die Längen der zu den cDNA Enden homologen Bereiche unterschiedlich lang sein (B6, XmnI-Sonde, kleinerer Homologiebereich als die übrigen Klone; ebenso B2, B4, B7, B8, NarI-Sonde; B5, NarI-Sonde bei geringerer Menge an untersuchter DNA (Abb. 23) im Vergleich zu den übrigen Klonen relativ starkes Hybridisierungssignal d.h. hier möglicherweise größerer Homologiebereich als bei den übrigen Klonen). Der zur XmnI-Sonde (3' Ende, Poly A) homologe Bereich scheint bei allen Klonen größer zu sein als der zur NarI-Sonde. Die bei B1, B2 und B3 nach Hybridisierung mit der XmnI-Sonde auftretenden schwachen Signale (Abb. 25 unten) könnten Hinweise für einen Partialverdau sein. Da die Konzentration an SalI jedoch im Überschuß eingesetzt wurde, müßte es sich folglich um für das Enzym schwer zugängliche Spaltstellen handeln.

Tab. XIII. Southernanalyse von B1-B8 Phagen DNA mit randständigen Fragmenten der miciti cDNA nach Spaltung mit SalI.

Klone	Hybridisierung mit der	
	NarI Sonde (5' Ende)	XmnI Sonde (3' Ende)
B1	++	+++
B2	+	+++
B3	++	+++
B4	+	+++
B5	++	++
B6	++	++
B7	+	+++
B8	+	+++

(+) schwaches, (++) mittel und (+++) starkes Hybridisierungssignal

4.2.4 Zwischenzusammenfassung

1. Die Southernanalyse von Leukozyten DNA mit der miciti cDNA läßt keine eindeutigen Aussagen zu über Anzahl und Größe des(r) L-Ketten Gen(e) im Genom. Sie läßt ein, zwei oder drei Gene in Frage kommen.
2. Die genomischen pitI Sequenzen (H-Kette) lassen keine zur miciti cDNA (L-Kette) homologen Sequenzen erkennen.
3. Durch die gewählte Klonierungsstrategie in EMBL3 wurden genomische miciti Sequenzen kloniert, die zum 5' und zum 3' Ende der miciti cDNA Sonde komplementäre Sequenzen tragen.

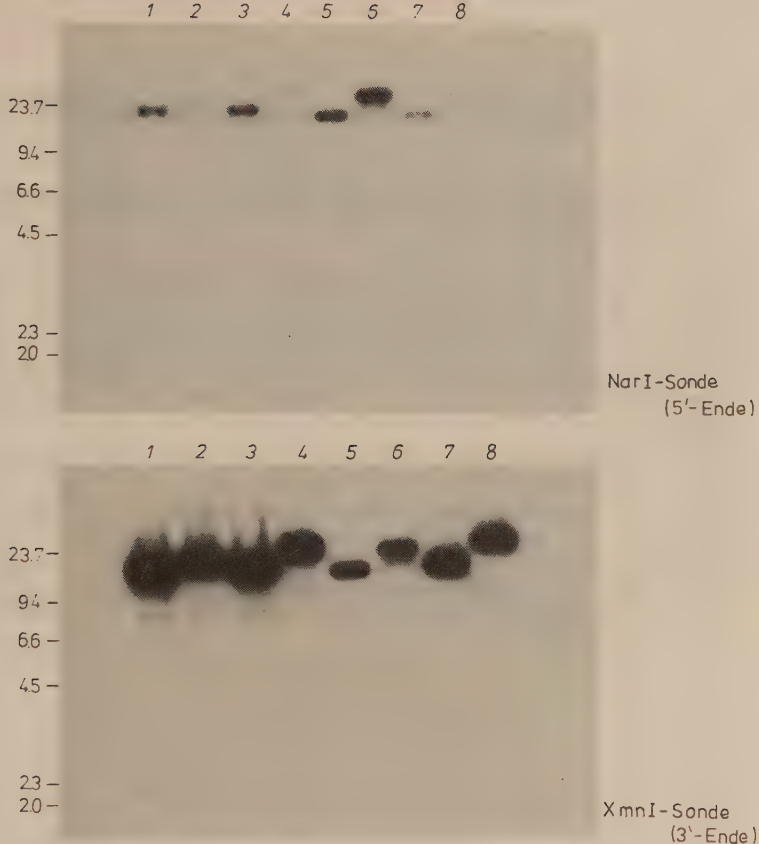


Abb. 25. Southernanalyse von B1-B8 Phagen DNA mit randständigen Fragmenten der miciti cDNA nach Sali Verdau.

Phagen DNA von B1-B8 (Spur 1-8) wurde mit Sali geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt (0.4%, E 2.4) und nach Transfer auf Nitrocellulosefilter (E 2.6) mit den randständigen Fragmenten der pitI Sonde hybridisiert (E 2.7.2).

Oberes Bild. Hybridisierung mit der NarI-Sonde (5'-Ende).

Unteres Bild. Hybridisierung mit der XmnI-Sonde (3'-Ende).

Als Längenstandard diente Lambda DNA mit HindIII geschnitten.

5 Untersuchung der miciti Phagenklone auf homologe DNA Bereiche

5.1 Untersuchung von B1-B8 auf homologe DNA Bereiche mit der H-Ketten cDNA (piti)

Um zu überprüfen, ob verschiedene DNA Sequenzen für das (die) H-Ketten (piti) und L-Ketten (miciti) Gen(e) kodieren, wurde die Phagen DNA von B1-B8 nach Restriktionsanalyse mit BamHI, EcoRI und HindIII und Southerntransfer mit der ^{32}P markierten piti cDNA (C 1.1) hybridisiert.

Die genomischen DNA Fragmente von B1-B8, die mit der miciti cDNA hybridisierten, ließen keine positiven Signale mit der piti cDNA erkennen (ohne Abb.). Da die piti Klone A1-A5 mit der miciti cDNA Sonde ebenfalls keine positive Hybridisierungsreaktion zeigten (C 3.3), könnte dies für eine unterschiedliche genomische Lokalisation beider Sequenzen sprechen.

5.2 Überlappende DNA Bereiche von B1-B8 (L-Kette)

Für die Restriktionskartierung der miciti Klone B1-B8 (Abb. 26) wurden die Restriktionsenzyme EcoRI, BamHI, SalI, HindII, XhoI, SstI, SphI, NcoI, ClaI, PstI und XbaI verwendet. Es wurden Restriktionskarten erstellt, die über die Größe der klonierten Fragmente, die Reihenfolge der Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI, EcoRI und SalI darauf sowie über die Länge des hybridisierenden Bereiches Aufschluß ergaben (Abb. 27 und 28). Die nachgeannten Restriktionsenzyme XhoI, SstI, SphI, NcoI, ClaI, PstI und XbaI erzeugten bei einigen Klonen so viel Fragmente, daß es nicht möglich war, die Positionen ihrer Schnittstellen bei allen Klonen völlig eindeutig und zweifelsfrei einzuzeichnen, um diese anschließend miteinander vergleichen zu können (Tab. IX). Die Schnittstellen dieser Enzyme konnten somit nicht exakt kartiert werden. Auch hier würde der Nachweis der Spaltstellen die Zuordnung von zu sequenzierenden DNA Fragmenten wesentlich erleichtern.

Die L-Ketten Klone unterscheiden sich durch die Größe ihres hybridisierenden Bereiches (Abb. 29). Dieser ist bei fünf (B1, B3, B4, B5, B6) von acht Klonen beidseitig von anderen humanen Sequenzen flankiert, woraus man folgern kann, daß alle hybridisierenden klonierten Fragmente natürlicherweise im Genom existierende Genformen darstellen können. Rechtes und linkes Genende sind bei diesen Klonen eindeutig festgelegt. B1 und B3 besitzen die längste ITI spezifische Genform (Pos. 7.2-12.0). Sie hat eine Länge von 4.8 kb und besitzt im linken Drittel in nicht kodierenden DNA Bereichen zwei Schnittstellen (Pos. 8.0; 9.0) für die Restriktionsendonuklease EcoRI. Bei B4 ist der hybridisierende Bereich durch eine Deletion am linken Genende um etwa 0.8 kb gegenüber B1 und B3 verkürzt (Abb. 29). B8 zeigt eine weitere Deletion der ITI spezifischen Region um 0.9 kb. Das Gen besitzt beidseitig endogene EcoRI Spaltstellen. Die Klone B5, B6 und B7 tragen einen gleich langen ITI positiven Bereich (Pos. 9.1-12.0). Infolge weiterer Verkürzung am linken Genende fehlt bei diesen Klonen die EcoRI Spaltstelle an Pos. 9.0. Das Gen besitzt nun linksseitig eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease BamHI, die durch die Klonierung regeneriert wurde.

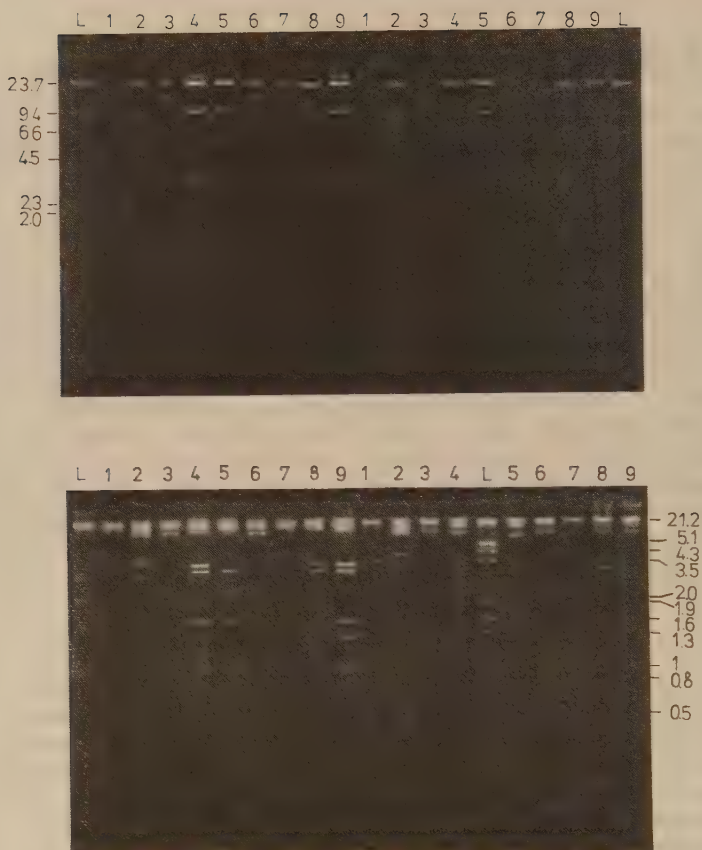


Abb. 26. Restriktionsanalyse von B3 und B4

Phagen DNA von B3 und B4 wurde mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen gespalten und auf 0.5%- (oben) und 1.2% igen (unten) Agarosegelen aufgetrennt:

Sali (Spur 1), Sali und BamHI (Spur 2), BamHI (Spur 3), EcoRI (Spur 4), EcoRI und BamHI (Spur 5), BamHI (Spur 6), Sali (Spur 7), Sali und EcoRI (Spur 8), EcoRI (Spur 9). Als Längenstandard diente Lambda DNA mit HindIII (0.5% Gel und 1.2% Gel) bzw. HindIII und EcoRI (1.2% Gel) geschnitten (Spur L). Die Fragmentgrößen sind in kb angegeben.



Abb. 27. Southernanalyse von B3 und B4.

Phagen DNA von B3 (links) und B4 (rechts) wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten (E 2.3), auf Agarosegelen aufgetrennt (E 2.4), auf Nitrocellulosefilter übertragen (E 2.6.1) und mit der miciti cDNA Sonde (C 2.1) hybridisiert (E 2.7.2): SalI (Spur 1), SalI und BamHI (Spur 2), BamHI (Spur 3), EcoRI (Spur 4), EcoRI und BamHI (Spur 5), BamHI (Spur 6), SalI (Spur 7), SalI und EcoRI (Spur 8), EcoRI (Spur 9). Als Längenstandard diente Lambda DNA mit HindIII geschnitten. Die Fragmentgrößen sind in kb angegeben.

Tab. IX Restriktionsschnittstellen von B1-B8

Enzym	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
-------	----	----	----	----	----	----	----	----

a.) gefunden/zugeordnet

BamHI	4/4	3/3	4/4	3/3	3/3	5/2	3/3	4/4
EcoRI	10/6	4/4	10/6	8/4	3/2	7/1	5/2	7/5
SalI	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2

b.) gefunden, aber nicht eindeutig zuordbar

HindII	11	11	11	11	11	11	11	11
XhoI	0	0	0	1	1	7	0	0
SstI	5	5	5	4	4	8	6	5
SphI	3	3	3	4	5	6	0	4
NcoI	7	7	7	9	9	11	0	8
ClaI	6	7	6	6	7	7	7	6
PstI	11	10	10	11	10	11	10	11
XbaI	3	4	4	1	1	4	0	5

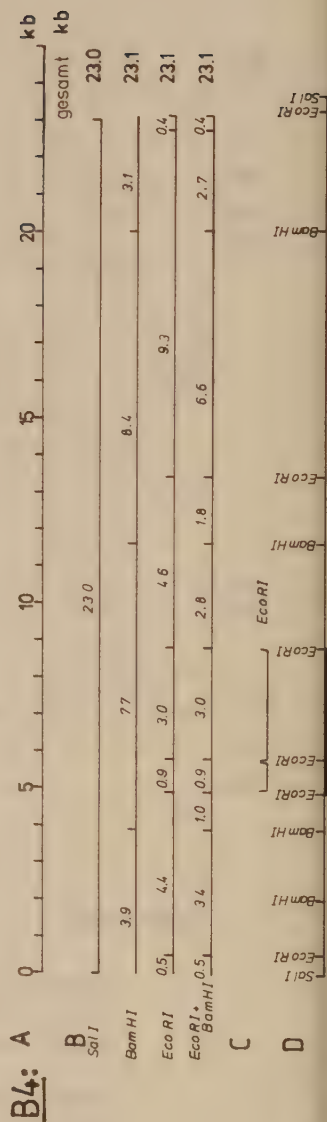
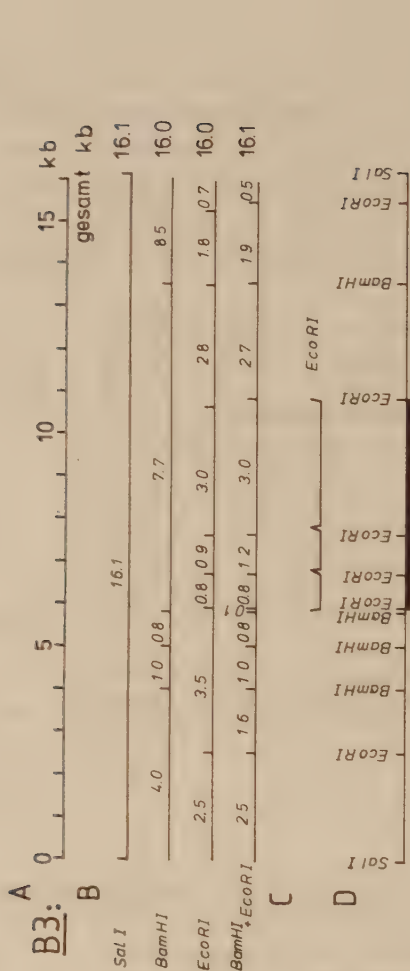
Abb. 28. Restriktionskarten der Klone B1-B8.

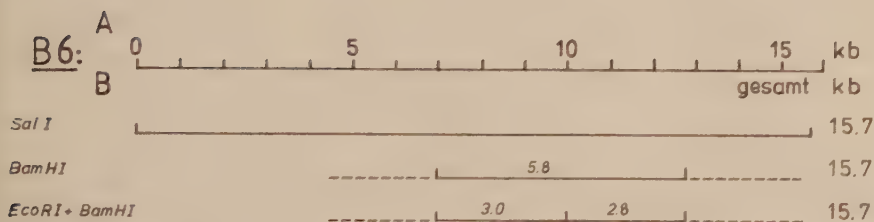
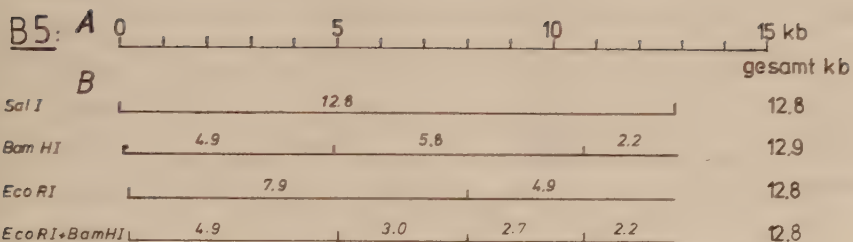
A Längenangabe (kb) in Skalenteilen

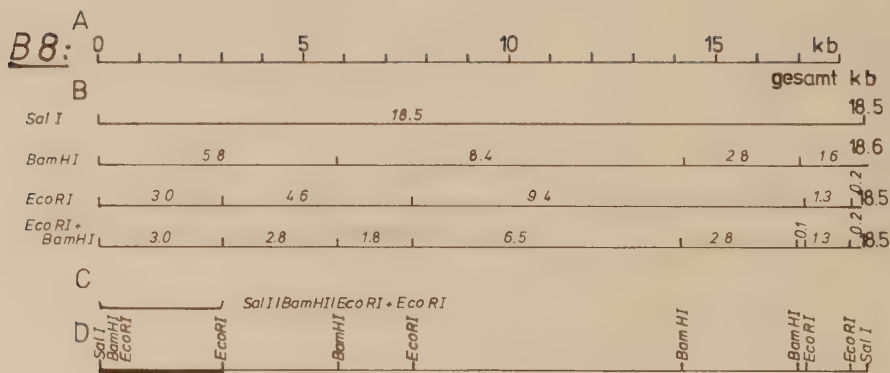
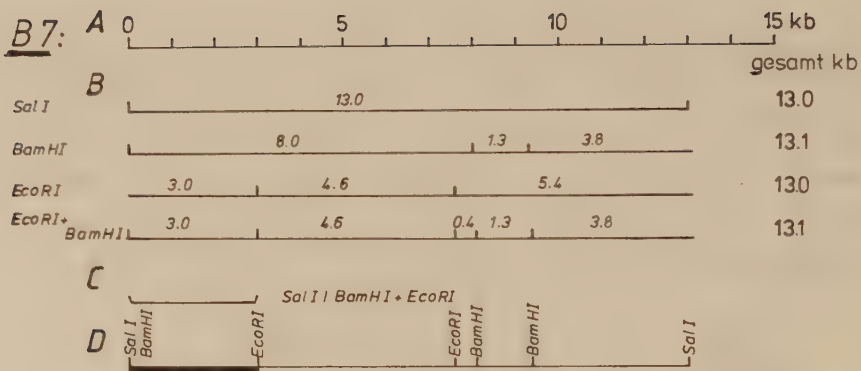
In B sind die Größen der nach Restriktionsverdau entstandenen Fragmente angezeigt.

C stellt die mit der micti Sonde hybridisierenden Fragmente dar.

Darunter (D) liegt die Restriktionskarte, wobei der dicke Balken L-Ketten DNA und der dünne Strich humaner ITI unspezifischer DNA entspricht.







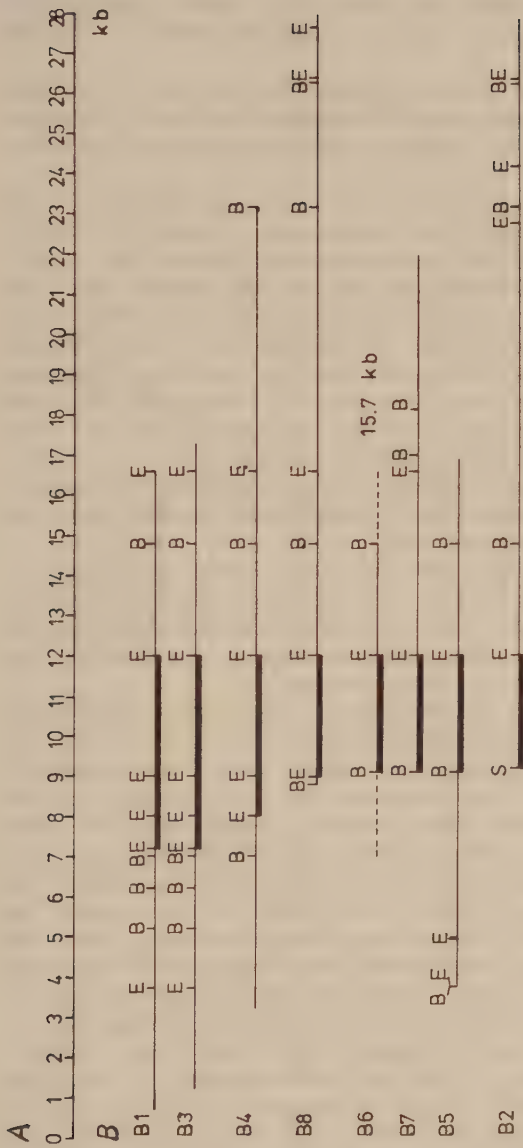


Abb. 29. A Längenangabe (kb) in Skalenteilen

B Darstellung homologer Bereiche der miciti Klone B1-B8

E = EcoRI, B = BamHI, S = SalI

Der Klon B2 hat eine weitere Deletion von wenigen Basenpaaren erfahren. Bei ihm konnte die BamHI Spaltstelle nach der Klonierung nicht wiederhergestellt werden (Abb.29).

Die Erstellung der Restriktionskarten in Abb. 28 wurde bei fast allen Klonen durch die auffallend hohe Anzahl an EcoRI Spaltstellen im flankierenden Genbereich erschwert (Abb. 26 1.2% Gel).

Von besonderem Interesse war dabei auch, daß bei allen Klonen außerhalb des hybridisierenden Bereiches BamHI- sowie EcoRI-Schnittstellen eliminiert wurden (Tab. IX). In der gleichen Reihenfolge wie bei den Klonen die Sequenzen am linken Genende deletiert wurden, könnte auch eine Reduktion der EcoRI Schnittstellen stattgefunden haben. Erst bei den Klonen B2 und B5, die die kürzesten hybridisierenden Bereiche tragen, war die Anzahl an EcoRI Spaltstellen so gering, daß die Reihenfolge ihrer Anordnung eindeutig festgelegt werden konnte.

Bezüglich der BamHI Schnittstellen waren in derselben Reihenfolge Eliminierungen, jedoch auch Neuplatzierungen (B7) zu beobachten (Tab. IX).

Die Eliminierung von Schnittstellen kann entweder auf Deletionen oder Mutationen als Folge von Klonierungsartefakten zurückzuführen sein, im Falle der Neuplatzierungen können Mutationen oder Rekombinationen als Ursache der Klonierungsartefakte in Frage kommen.

Die Klone B2, B7 und B8 können auch unterschiedliche Partialklone der längeren Genformen von B1 (bzw.B3), B4 oder B5 (bzw. B6) darstellen (Abb. 30). In diesem Fall wäre das Gen durch die Klonierung am linken Ende fragmentiert worden. Beim Partialverdau wurde dabei an drei unterschiedlichen, unmittelbar benachbarten MboI Spaltstellen im Gen geschnitten, weshalb sich die Länge der Genabschnitte dieser Klone nur minimal unterscheidet. Bei zweien (B7 und B8) konnte nach der Klonierung mit der Tetranuklease MboI die BamHI Schnittstelle regeneriert werden. Falls die Reihenfolge der Klone, wie in Abb. 30 dargestellt, zutrifft, existieren lediglich drei Genformen des L-Ketten Gens im Genom. Vertreter sind B1 (bzw. B3) für die längste, B4 für die zweitlängste sowie B5 (bzw. B6) für die kürzeste Genform. B8 stellt einen Partialklon der Genform von B1 (bzw. B3) oder B4 dar. B5 und B6 könnten identische Fragmente enthalten und somit dieselbe Genform darstellen. B2 und B7 können Teilklone

jeder längeren Genform (B1(bzw. B3), B4, B5 (bzw. B6)) sein. Eine genaue Aussage über die Anzahl existierender Genformen ist nur durch eine Wiederholung der Klonierung möglich.

Es wurden insgesamt 27.3 kb humane genomische Sequenzen kloniert. Die L-Ketten positiven Sequenzen der isolierten Klone haben folgende Längen: 4.8 kb (B1, B3), nach Deletion 3.9 kb (B4), 3.2 kb (B8), 2.8 kb (B5, B6, B7) und 2.6 kb (B2). Struktur 1 enthält vier, Struktur 2 drei, Struktur 3 zwei und Struktur 4 eine Schnittstelle für das Enzym EcoRI in nicht kodierenden DNA Regionen. Keine der Genformen enthält eine Spaltstelle für die Restriktionsendonuklease BamHI.

5.2.1 Vergleich der Ergebnisse der Restriktionskartierung von B1-B8 (Abb. 29 und Abb. 30) mit den Ergebnissen der Hybridisierung mit endständigen Fragmenten der miciti cDNA in C 4.2.3.2 (Tab. XIII)

Da die Phagen DNA von B1-B8 mit der XmnI Sonde (210 bp 3' Ende der cDNA) eine sehr starke positive Reaktion zeigt und alle hybridisierenden Fragmente nur ein gemeinsames Genende umfassen, stellt das in Abb. 29 und 30 rechte Genende der Klone mit großer Wahrscheinlichkeit das 3' Ende des L-Ketten Gens dar (Pos. 12.0). Die Intensitätsunterschiede bei den Hybridisierungssignalen bei B5 und B6 sind auf unterschiedliche Mengen an untersuchter DNA bei der Southernanalyse oder einen schlechteren DNA Transfer bei diesen Klonen zurückzuführen.

Daß trotz kürzerer Genlängen am 5' Ende bei B5 und B6 mit der NarI-Sonde (240 bp, 5' Ende der cDNA) eine gleich starke Hybridisierungsreaktion wie bei den längsten Genformen (B1, B3) stattgefunden hat, kann dadurch erklärt werden, daß die zur NarI-Sonde komplementären genomischen Sequenzen auf beiden Klonen vollständig vorhanden sind. Die weniger intensiven Signale von B2, B4, B7 und B8 mit der NarI Sonde sind insofern verständlich, daß der zur miciti cDNA Sonde (Partialklon) sequenzhomologe Bereich bei diesen Klonen kürzer als bei B1 und B3 ist. Mit Sicherheit befinden sich nicht kodierende Sequenzen am 5' Ende des Gens (EcoRI Schnittstellen an Pos. 7.3; 8.1;

9.0), wodurch die Exonsequenzen unterbrochen werden und die Hybridisierungsreaktion bei allen Klonen erklärbar ist.

5.2.2 Vergleich der Restriktionskartierungsdaten von B1-B8 (Abb. 29 und Abb. 30) mit den Ergebnissen der Southernanalyse mit der miciti Sonde in C 4.1 (Abb. 19)

Alle klonierten und nach Spaltung mit der Restriktionsendonuklease EcoRI entstehenden Fragmente von 7.0 kb, 3.0 kb, 0.9 kb sowie 0.8 kb (Abb. 29 und 30) können dem Blot eindeutig zugeordnet werden. Auch die nach Spaltung mit BamHI entstandenen Fragmente von 7.7 kb und 5.7 kb stimmen mit den hybridisierenden Banden der Southernanalyse überein. Somit scheiden die in C 4.1 in Erwägung gezogenen Möglichkeiten für zwei (Abb. 20B) und drei (Abb. 20C) Gene aus. Da alle klonierten und ITI spezifischen Fragmente im Southernblot von genomischer DNA mit der L-Ketten Sonde wiedergefunden werden, kann auch mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, daß es sich bei den verschiedenen Genformen um Klonierungsartefakte handelt. Die Ergebnisse lassen infolgedessen den Schluß zu, daß es sich um in vivo im Genom existierende Genformen handelt.

5.3 Zwischenzusammenfassung

1. H- und L-Ketten Gen besitzen unterschiedliche genomische Sequenzen.
2. Es existiert nur ein miciti-L-Ketten Gen im menschlichen Genom.
3. Es existieren mindestens drei unterschiedliche Genformen der ITI L-Kette, die sich bezüglich ihrer Länge am 5' Ende unterscheiden.
4. Durch die Klonierung konnte das 5' und 3' Ende aller L-Ketten Genformen erfaßt werden.

D Diskussion

Zur Untersuchung der genomischen Organisation des humanen Inter- α -Trypsininhibitors wurden ITI spezifische Sequenzen in einen Phagenvektor kloniert und durch Hybridisierung mit einer H- und einer L-Ketten cDNA Sonde die jeweiligen ITI positiven Klone identifiziert. Durch anschließende Restriktionskartierung und Southernanalyse mit den beiden Sonden wurden die klonierten ITI spezifischen DNA Sequenzen charakterisiert.

1 Sequenzverwandtschaft von L- und H-Ketten

Die Untersuchung der L- und H-Ketten Sonden (piti, miciti) auf gegenseitige Kreuzreaktion sowie auf Kreuzreaktion mit den jeweiligen genomischen Sequenzen durch Hybridisierung ließ keine gemeinsamen homologen DNA Bereiche erkennen. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren überein, denen die Isolierung von Polypeptiden durch Immunpräzipitation (Bourguignon et al., 1983) bzw. von cDNA Fragmenten durch Immunoscreening (Salier et al., 1987) ebenfalls nur mit spezifischen Antiseren für die H- und die L-Kette gelang. Dies spricht für die Existenz nicht miteinander sequenzverwandter Polypeptide im ITI. Entsprechend fanden Bourguignon et al. (1983) nach Größenselektion von Pavianleber mRNA und anschließender Immunpräzipitation mit Antiserum gegen humanen ITI im zellfreien System zwei verschiedene mRNA Populationen, die für zwei immunologisch unterschiedliche Polypeptide, schwere (90 kd) und leichte (40 kd) Kette des ITI, kodieren.

2 Intaktheit des für die L-Kette kodierenden Gens

Bei fünf (B1, B3, B4, B5, B6) von acht durch Plaquehybridisierung identifizierten Klonen B1-B8 (Abb. 29) sind die ITI spezifischen Sequenzen beidseitig von anderen genomischen Sequenzen flankiert. Desweiteren unterscheiden sich die Klone B1-B8 in der Länge des hybridisierenden Bereiches. Da alle klonierten ITI spezifischen Fragmente in der Southernanalyse von Leukozyten DNA mit der L-Ketten cDNA wiedergefunden werden, kann man mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließen, daß es sich bei den Klonen mit den kürzeren ITI spezifischen Regionen (B2, B4, B5, B6, B7, B8) um deletierte Formen des Strukturgens (B1 (B3)) handelt, die infolge des Klonierungsvorganges entstanden sind. Es sollte sich deshalb um natürlicherweise im Genom vorkommende Genformen handeln, die sich in ihrer Länge am 5'-Ende unterscheiden.

Die Länge der zum Screenen verwendeten cDNA Sonde betrug 952 bp. Dies entspricht 78% der von Kaumeyer et al. (1986) bestimmten Gesamtlänge (1221 bp) für die inhibitorische L-Kette.

Bei einer Genlänge von 5 kb (B1, B3), 4 kb (B4), 3.1 kb (B8), 3 kb (B5, 6, 7) und 2.8 kb (B2) (abgeschätzt unter Elektrophoresebedingungen) beträgt der nicht informative Genanteil (Intronbereich) somit das 4-, 3.3-, 2.5-, 2.6- und 2.3-fache der jeweiligen Genform. Die klonierten Größen von 12-23 kb partial verdauter DNA aus dem Sucrose-Gradient, die nicht durch artifizielle Ligierung von nicht benachbarten Fragmenten entstanden sind sowie der relativ kurze Intronbereich in α_1 m-UTI gegenüber einer Exonlänge von 1221 bp tragen Rechnung dafür, daß trotz partieller Länge der cDNA Sonde 'vollständige' Genprodukte isoliert wurden (Abb. 29).

3 Unterschiedliche Genlängen der L-Kette

Durch Deletion von EcoRI Fragmenten (0.8 kb und 0.9 kb) am 5' Genende sowie zusätzliche Trunkierung oder Rearrangements (infolge Deletion oder Mutation) am selben Genende sind verschieden lange Genkonstrukte entstanden. Diese unterschiedlichen Genformen sollten, da sie alle

bei der Southernanalyse von genomischer DNA wiedergefunden werden und beidseitig von anderen genomischen DNA-Sequenzen flankiert sind, in vivo im Genom existieren. Das könnte bedeuten, daß entweder mehrere L-Ketten Gene existieren oder Pseudogene bzw. prozessierte Gene ('retropseudogenes') entstanden sind. Da mit einer cDNA Sonde, die 78% der gesamten Genlänge umfaßt, gescreent wurde, ist es eher unwahrscheinlich, daß mit dieser Sonde verschiedene Gene identifiziert wurden. Falls es sich um unterschiedlich lange Genformen des ITI L-Ketten Gens handelt, können für die Transkription und Translation folgende alternative Hypothesen aufgestellt werden:

(a) Alle Genformen werden transkribiert und translatiert. Nur die längsten Transkripte (B1, B3) exprimieren ein funktionsfähiges Protein.

(b) Alle Genformen werden transkribiert und liefern aktive Proteine. Die längsten Transkripte von B1, B3 und B4 tragen am 5' Genende nicht informative Sequenzen, die beim Reifungsprozess der mRNA herausgespalten werden. Das würde bedeuten, daß mehrere Transkriptionsstartsignale im selben Leserahmen existieren müssen und das am weitesten downstream liegende für das aktive Protein kodiert.

(c) Es wird nur das Transkript der längsten Genform gebildet, da bei den übrigen Genformen notwendige Signalsequenzen am 3' Ende fehlen.

Den Möglichkeiten (1) und (2) stehen die Ergebnisse von Bourguignon et al. (1983) entgegen. Die Autoren konnten zeigen, daß nach Größenselektion von Poly A⁺ mRNA, in vitro Translation und anschließender Immunpräzipitation neben einer mRNA Population für die schwere (H)-Kette, nur eine weitere mRNA Population existiert, die für das 40 kD Translationsprodukt (Leichte Kette) kodiert. Entsprechend fanden sie nach in vitro Translation von Pavianleber mRNA und Immunpräzipitation mit menschlichem ITI spezifischem Antiserum neben einem hochmolekularem Polypeptid von 90 kD nur ein weiteres, niedermolekulares von 40 kD (Leichte Kette).

Weiteres Beweismaterial für die Existenz nur einer einzigen mRNA, die für eine leichte Kette mit inhibitorischer Aktivität kodiert, wurde auch von anderen Autoren er-

bracht. Derselbe cDNA Klon, der für das α_1 m-UTI Protein kodiert, wurde durch Screenen unterschiedlicher menschlicher Leber cDNA Genbanken mit unterschiedlichen Sonden gefunden. Bourguignon et al. (1985) und Kaumeyer et al. (1986) fanden diesen Klon durch Screenen mit Oligonukleotidsonden, die aus den beiden Kunitz Typ Domänen des UTI abgeleitet waren. Von Schreitmüller et al. (1987) wurde ein identischer Klon durch Screenen mit Antikörpern, die gegen humanen ITI gerichtet sind, isoliert. Die Identifizierung von nur einem Gen entspricht auch dem Ergebnis, welches beim Screenen mit einer cDNA Sonde, die 78% der gesamten Genlänge umfaßt, erwartet wird.

Da die Ergebnisse mehrerer Autoren (Bourguignon et al., 1985; Kaumeyer et al., 1986; Schreitmüller et al., 1987), die durch unterschiedliche experimentelle Vorgehensweisen erzielt wurden, darin übereinstimmen, daß nur eine mRNA Population für die inhibitorische Domäne (Leichte Kette) des ITI existiert, kann nur die Möglichkeit (3) als Erklärung in Betracht gezogen werden. Das bedeutet, daß durch Veränderungen am 5'-Ende rudimentäre Genformen (Pseudogene oder 'processed genes') entstanden sind. Diese können wie folgt gebildet werden:

(1) Pseudogene (funktionslose Relikte einst funktioneller Gene)

Die Genformen unterschiedlicher Genlänge gehören einer gemeinsamen Genfamilie ('Cluster') an, deren Mitglieder durch Duplikation eines Urgens (B1,B3) entstanden sind (Little, 1982). B4 und B8 können zusätzlich durch ungleiches 'crossing over' oder Rekombination Deletionen erfahren haben (Lewin, 1987). Durch diese Veränderungen sind die Signalsequenzen für den Transkriptionsstart entfernt worden, so daß keine mRNA mehr gebildet werden kann. B2, B5, B6, B7 sind aus den verkürzten Formen B4 und B8 durch weitere Mutationen entstanden (Abb. 29 und Abb. 30).

(2) Prozessierte Gene ('retropseudogenes')

Prozessierte Gene, auch als 'processed retropseudogenes' bezeichnet (Hollis et al., 1987), ähneln der cDNA Kopie einer prozessierten mRNA. Sie beinhalten immer das 3'

Ende (Poly A) des parentalen mRNA Moleküles und vermissen Intronbereiche des parentalen Gens. Dies entspricht wahrscheinlich den vorliegenden Ergebnissen. Genveränderungen am 5' Ende der prozessierten mRNA von 'retropseudogenes' sind nicht ungewöhnlich. Sie können auf folgende Weise gebildet werden:

(a) Die Verkürzungen am 5' Ende entstehen durch Insertion eines anderen Retroposons (Shimada et al., 1984; Scarpulla, 1984). Das würde bedeuten, daß die beiden Genformen im Genom unmittelbar benachbart vorliegen.

(b) Das prozessierte Retropseudogen ist das Produkt eines defekten Transkriptes, welches durch fehlerhaftes Spleißen oder durch eine Initiation downstream der normalen cap-site entstanden ist. Beispielsweise vermißt das Retropseudogen, welches sich von der menschlichen leichten λ -Kette ableitet, die V-Region (Hollis et al., 1982), während hingegen das Retropseudogen der menschlichen schweren ϵ -Kette die VDI-Region vermißt (Battey et al., 1982; Ueda et al., 1982).

(c) Die kürzeren Genformen von B2, 4, 5, 6, 7, 8 stellen partiell gespleißte reverse Transkripte der Inter- α -Trypsininhibitor prä-mRNA dar. Dieser Erklärungsmöglichkeit steht jedoch die hohe Anzahl an Retropseudogenen gegenüber, die die volle Länge besitzen (Weiner et al. 1986).

Eine genaue Aussage über die Anzahl der vorliegenden Genformen ist nur durch eine Wiederholung der Klonierung und anschließende Sequenzierung möglich.

Nach Transkription ins Genom zurückintegrierte Sequenzen können z. B. während einer früheren überwundenen Infektion mit Retroviren entstanden sein. Sie werden nach Bildung von cDNAs an beliebiger Stelle wieder in das Genom eingebaut. Da die Sequenzen vererbt werden, müssen sie in Zellen vorhanden sein, die Keimzellen hervorbringen. Da alle Genformen länger als die von Kaumeyer et al. (1986) bestimmte mRNA Länge von 1.2 kb sind, müssen Introns in ihnen existieren. Da die notwendigen Promotorelemente für die RNA-Polymerase II upstream von der Transkriptionsstartstelle liegen, wird selbst die Retroposition einer korrekt initiierten mRNA nahezu immer ein

inaktives Retropseudogen erzeugen. Z.B. ist das prozessierte Methallothionein II Retropseudogen inaktiv, obwohl die kodierende Region intakt geblieben ist (Karin et al., 1984). Für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bedeutet dies, daß, falls es sich bei den verkürzten Formen um Retropseudogene handelt, nur die längsten Transkripte von B1 und B3 für aktive Polypeptide kodieren (Abb. 29). Inaktive Retropseudogene unterliegen Mutationen und degenerieren meist durch neutralen Drift. Bei Duplikation oder Translokation auf der DNA-Ebene bleiben die flankierenden regulatorischen Elemente (sowie Introns) erhalten, sodaß der neue Locus potentiell aktiv ist und zusätzlich zum neutralen Drift einem positiven oder negativen Selektionsdruck unterliegt.

Unter den Globingenen wurde bisher das größte Repertoire an Pseudogenstrukturen beobachtet (Little, 1982): Sequenzanalysen von Pseudogenen beim Menschen wurden von Proudfoot & Maniatis (1980), bei der Maus von Leder et al. (1980) und Vanin et al. (1980), bei der Ziege von Cleary et al. (1981) und beim Kaninchen von Lacy & Maniatis (1980) durchgeführt.

Bei den bisher charakterisierten Proteinaseinhibitoren wurden keine Retropseudogene beschrieben (Kap. B2). Möglicherweise handelt es sich bei den bisher nicht näher charakterisierten verwandten Sequenzen des α_1 -Proteinaseinhibitor- sowie des α_1 -Chymotrypsin-Strukturgens um solche Sequenzen (Kap. B2).

4 Intaktheit des für die H-Kette kodierenden Gens

Die Bedeutung der aus der H-Ketten cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenzen für das Inhibitormolekül ist unklar. Zum Zeitpunkt der beschriebenen Experimente wurde für sie eine mögliche Trägerfunktion für den inhibitorischen Teil des ITI Moleküls in Betracht gezogen, für deren Bestätigung jedoch keine experimentellen Daten vorhanden sind. Durch Southernanalyse mit der H-Ketten Sonde wurde die Genlänge zu ca. 27 kb bestimmt. Der gesamte durch die Klonierung erfaßte Bereich von 21.2 kb beträgt 80% des gesamten Gens. Die Länge der zum Screenen der Genbank

verwendeten cDNA von 2.26 kb (Gebhard et al. 1987) umfaßt 8.3% der Genlänge bzw. 10.7% des klonierten Bereiches. Der Intronbereich mißt 23.9 kb (89%) des gesamten Gens.

Durch die Klonierung wurde das 3' Ende des Gens erfaßt (Abb.17). Zwei der Klone tragen ausschließlich ITI-spezifische Sequenzen. Die 5'-terminalen Sequenzen wurden wahrscheinlich nicht erhalten, da 829 bp am 5' Ende der cDNA-Sonde fehlten. Desweiteren entsprach die Anzahl der untersuchten Alu-positiven Phagenklone der von Clark & Carbon (1976) zur Isolierung eines 'single copy' Gens geforderten Anzahl. Das würde bedeuten, daß das 5' Ende der H-Ketten cDNA Sonde unmittelbar an einen Intronbereich des H-Ketten Gens anschließt. Weiter upstream liegende exonkodierende Sequenzen, die auf der cDNA Sonde fehlen, können somit durch die Hybridisierung nicht erfaßt werden.

A3 besitzt im Anschluß an den hybridisierenden Bereich von 9.7 kb zusätzlich ein 1.9 kb langes, nicht hybridisierendes Fragment mit Spaltstellen für HindIII, EcoRI und XbaI (Abb. 17), die bei den übrigen Klonen in diesem DNA-Abschnitt nicht gefunden wurden. Dieser nicht homologe Abschnitt (Abb. 17 Pos. 12.8 ab HindIII-Spaltstelle) könnte durch Rearrangements von DNA-Abschnitten während einer ursprünglichen Genduplikation oder nachfolgender evolutionärer Divergenz angegliedert worden sein. Derartige Rearrangements können funktionelle Bedeutung haben wie z.B. die nicht homologen Genabschnitte in Promotor- und Intronregion von BPTI- und SI-Gen, die möglicherweise für eine gewebsspezifische Expression verantwortlich sind (Creighton & Charles, 1987).

Neue Genprodukte können aber auch durch Verschiebung ganzer DNA-Blöcke, die unterschiedlichen Exonregionen entsprechen, entstehen, wie an den Mosaikstrukturen der daraus resultierenden Proteine offenbar wird (Doolittle, 1985). Die Entstehung von Mosaikstrukturen während der Evolution wurde auch zwischen zwei prepropankreatischen Polypeptiden beobachtet (Yamamoto et al., 1986).

Aufgrund der Ergebnisse der Restriktionsanalyse (typisches XbaI/BamHI Spaltmuster) sowie der Hybridisierungsexperimente kann mit großer Wahrscheinlichkeit gesagt werden, daß alle Klone A1-A5 Sequenzen tragen, die Teile eines gemeinsamen Gens darstellen. Die ITI spezifischen Sequenzen besitzen einen Intronabschnitt von 1.6 kb

(Pos. 12.8-14.4 kb Abb. 17).

5 Genomische Organisation der ITI Gene

DNA aus Leukozyten wurde mittels Southernanalyse mit der piti-H-Ketten- und der miciti-L-Ketten cDNA auf die Existenz ITI spezifischer Sequenzen untersucht.

Sowohl für die leichte als auch für die schwere Kette des ITI konnten Größe und Anzahl aller klonierten Fragmente den hybridisierenden Banden des Blottes zugeordnet und damit die Existenz von jeweils einem Gen bzw. mehreren Genformen bei der L-Kette im menschlichen Genom bestätigt werden.

Falls ITI aus mehr als den beiden durch Klonierung und Southernanalyse nachgewiesenen Genen besteht, sollten zusätzliche cDNA Sequenzen existieren. Schreitmüller et al. (1987) berichten über weitere Sequenzen, die zu den Sequenzen des bisher bekannten H-Ketten Gens entfernt verwandt sind. Sie weisen keine Homologien zu den Sequenzen des HI-30 Fragmentes auf.

Desweiteren gelang es Gebhard et al. (1988) durch Westernblotanalyse mittels Antikörpern, die gegen humanen ITI gerichtet sind, drei verschiedene Proteine nachzuweisen. Nach Fraktionierung von Plasma durch Ammoniumsulfatfällung und anschließende Ionenaustauschchromatographie wurden neben nativen ITI (Molekulargewicht 240 kD) vier weitere immunreaktive Proteine mit Molekulargewichten von 130-140 kD (dissoziiert in kleinere Proteinmoleküle mit Molekulargewichten von 85 kD, 78 kD und 56 kD), 85 kD, 78 kD und 56 kD in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gefunden. Die inhibitorische Aktivität konnte dem kleinsten Fragment zugeordnet werden.

Die Ergebnisse von Schreitmüller et al. (1987) und Gebhard et al. (1988) lassen die Schlußfolgerung zu, daß ITI aus mindestens drei Komponenten aufgebaut ist, die in vivo in unterschiedlichen Mengenverhältnissen zu einem Komplex "assoziiert" sind. Die Inhibitorodomänen stellen dabei nur einen Teil des reifen ITI-Komplexes dar (Salier et al., 1987; Schreitmüller et al., 1987). Eine unabhängig regulierte Biosynthese der einzelnen ITI-Komponenten

in diesem Komplex könnte eine Erklärung für die von Chawla et al. (1978) und Salier et al. (1983) beobachteten Befunde geben, bei denen bei Patienten mit Entzündungsprozessen und neoplastischen Krankheiten neben einer erhöhten Konzentration von HI-30 keine Abnahme der ITI-Konzentration selbst gefunden wurde. Die unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen ausgelöste selektive Erhöhung der Expression des Kunitz-Typ Inhibitorproteins würde dann einer gleichbleibenden Menge der übrigen komplexbildenden Komponenten gegenüberstehen (Gebhard et al., 1988). Letztere würden dann die limitierenden Faktoren für eine konstante ITI-Menge darstellen bzw. diese bedingen.

Aus der cDNA eines dieser beiden H-Ketten Klone kann die komplette Aminosäuresequenz eines Vorläufermoleküles der zweiten Proteinkomponente abgeleitet werden. Das Precursormolekül enthält sowohl ein Signalpeptid- als auch eine Propeptidsequenz (Gebhard et al., 1988), deren Aminosäuresequenzen sowie NH₂-Aminosäuresequenzen bisher nicht in Aminosäuresequenzanalysen von ITI gefunden wurden. Eine N-terminale Signalsequenz wurde auch beim bovinen pankreatischen Trypsininhibitor gefunden (BPTI) (Creighton & Charles, 1987). Sie spricht für den Transport des Proteins durch Membranen. Den Ergebnissen von Gebhard et al. (1988) und Schreitmüller et al., (1987) stehen neuere Ergebnisse von Jessen et al. (1988) gegenüber. Nach Inkubation von Serum sowie gereinigtem ITI mit Hyaluronidase aus Rinderhoden oder Chondroitinase ABC, die beide Spezifität für Chondroitin-sulfat besitzen, konnte ITI gespalten und dabei lediglich in zwei immunologisch nicht identische Komponenten (Molekulargewicht 160 kD H-Kette; 26 kD L-Kette) zerlegt werden. Die N-terminalen Aminosäuresequenzen, die in gleichen Mengen vertreten waren, entsprachen den Sequenzen nur einer H- und einer L-Kette. Ebenso fanden Salier et al. (1987) nach Aminosäureanalyse von gereinigtem ITI nur zwei unterschiedliche N-terminale Sequenzen, die entweder dem N-Terminus einer H-Kette oder den N-terminalen Sequenzen des HI-30 Fragmentes entsprachen.

Die bisher vorliegenden Ergebnisse lassen somit keine eindeutige Schlußfolgerung zu, ob ITI einen Komplex bestehend aus zwei oder sogar drei unterschiedlichen Proteinen darstellt oder eine Mischung unterschiedlicher Komplexe aus mindestens zwei Komponenten mit ähnlichen

Molekulargewichten.

ITI unterscheidet sich von den bisher charakterisierten humanen Proteinaseinhibitoren (Kap. B) sowohl durch die Zwei-Domänen Struktur als auch durch die Existenz einer zusätzlichen zur inhibitorischen Komponente (L-Kette) vorhandenen nicht inhibitorischen H-Kette. Die bisher bei Entzündungsprozessen beobachteten erhöhten Serumwerte und Exkretionsraten des HI-30 Fragmentes sowie das im Urin von Tumorpatienten vermehrt ausgeschiedene HI-30 Fragment könnten darauf hindeuten, daß es sich möglicherweise um ein Hitzeschock Protein handelt, welches als Reaktion der Zelle auf unterschiedliche Stressbedingungen (Temperaturerhöhung, Sauerstoff- oder Nährstoffmangel) hin ausgeschieden wird. Sauerstoff- sowie Nährstoffmangel können z. B. während der Entwicklung eines Tumors entstehen (Vaupel, 1982). Die Molekulargewichte von Stressproteinen liegen im Größenbereich von 28, 34, 46, 56, 68, 70, 76, 89, 97, 110 und 174 kD (Subjeck and Shyyt, 1986). Expressionsstudien über Stressproteine (Kelley and Schlesinger, 1982) haben gezeigt, daß die meisten von ihnen auch in Zellen und Geweben unter physiologischen Bedingungen, wenn auch in viel geringerer Konzentration, exprimiert werden. Die Ratte besitzt ein durch Hitze induzierbares hsc73 Gen. Bei der Mehrzahl der hsc73 verwandten Sequenzen im Rattengenom handelt es sich ebenfalls um prozessierte Pseudogene (Sorger and Pelham, 1987).

Zusammenfassend kann man sagen:

1. Die genomischen H- und L-Ketten Gensequenzen des menschlichen Inter- α -Trypsininhibitors besitzen mit großer Wahrscheinlichkeit unterschiedliche genomische Sequenzen.
2. Die identifizierten H- und L-Gene existieren als 'single copy' Gen im menschlichen Genom.
3. Das H-Ketten Gen besitzt eine Länge von ca. 27 kb, wobei der Intronbereich 88% der Gesamtlänge ausmacht.
4. Die unterschiedlichen Längen der Genformen der L-Kette stellen mit großer Wahrscheinlichkeit prozessierte Gene (Retropseudogene) dar. Das Strukturgen besitzt eine Länge von etwa 5 kb. Der Intronbereich beträgt etwa 25% der gesamten Länge.

6 Ausblick

Im Hinblick auf eine gründliche Strukturanalyse des ITI sowie zum näheren Verständnis seiner physiologischen und pathophysiologischen Wirkungsweise und Funktion ergeben die beiden isolierten Gene neue Perspektiven für die Durchführung weiterer Experimente.

Die unterschiedlichen genomischen Sequenzen des H- und L-Gens lassen annehmen, daß beide nicht durch Genduplikation entstanden sind. Die Kenntnis der Lage ihrer Introns durch Sequenzanalyse sowie Existenz und Anzahl von Substitutionsmutationen ließen durch Vergleich mit den cDNA Sequenzen Rückschlüsse zu über die evolutionäre Entstehung der beiden Gene (konvergente oder divergente Entwicklung sowie den Zeitraum seit ihrer Entstehung).

Weiterhin könnte eine Sequenzanalyse zeigen, ob die Zweidomänen Struktur des ITI durch die Intron-Exon Organisation ihre Entsprechung findet.

Desweiteren können durch Sequenzanalyse die regulatorischen Elemente (Enhancer- und Promotorregion, Stopcodon) der beiden Gene bestimmt und lokalisiert werden, die im Zusammenhang mit Expressionsstudien die Frage beantworten, ob die Koordination der Expression der beiden Gene gemeinsam durch einen Promotor mit derselben Sequenz geregelt wird oder jedes der beiden Gene einen eigenen funktionellen Promotor besitzt.

Falls es sich um (ein) Hitzeschock Protein(e) handelt, sollten im Promotorbereich die für diese Proteine spezifischen Hitzeschockelemente (HSE), die meist in vielfacher Ausführung vorliegen und als Enhancersequenzen fungieren, identifiziert werden können.

Wenn die beiden Gene durch verschiedene Promotoren gesteuert werden, könnte durch eine Chromosomenanalyse gezeigt werden, ob sie auf unterschiedlichen Chromosomen liegen. Da ihre Regulation dann in jedem Fall unabhängig voneinander erfolgt, wäre es interessant, herauszufinden, auf welcher Ebene die Regulation der beiden Gene erfolgt (z. B. Transkriptionsebene, Rückkoppelungseffekt).

E Material und Methoden

1 Material

1.1 Bakterienstämme

BHB 2688 (Hohn, 1979)

N205recA⁻ (ϕ imm⁴³⁴, cIts857, b2, red3, Eam4, Sam7)

BHB 2690 (Hohn, 1979)

Isogen mit BHB 2688, außer daß dieses Lambda-Lysogen die Dam 15-, statt der Eam-Mutation trägt.

JM 83 (Vieira und Messing, 1982)

ara, (lac, pro), strA, thi-1, (O80dlacZ M15)

Aufgrund des fehlenden lacI^q-Allels erfolgt eine Komplementation auch in Abwesenheit von IPTG.

HB101 (Boyer und Roulland-Dussoir, 1969)

F⁻, hsdS20 (r⁻_B, m⁻_B, supE44, ara-14, galK-2, lacY1, proA2, rpsL20 (str^R), Xyl-5, mtl-1, λ ⁻, recA 13. Dieser Stamm stellt eine Kreuzung aus E. coli K12 und E. coli B dar. Ihm fehlen die E. coli B spezifischen (aber nicht die K-spezifischen) Restriktions- und Modifikationssysteme. Er ist recA⁻.

Q358 (Karn et al., 1980)

hsdR_K⁻, hsdM_K⁺, supF, ϕ 80^r su⁺-Wirt, verwendet für das Wachstum von 1059.

Q359 (Karn et al., 1980)

hsdR_K⁻, hsdM_K⁺, supF, ϕ 80^r, P2 su⁺-Wirt, verwendet für die Erkennung von spi⁻ Rekombinanten.

WL87 (W. Lehrach, Kanada)

1.2 Bakteriophagen

EMBL3	Frischauf, 1983
EMBL4	Frischauf, 1983

1.3 Plasmide

pTZ19R Pharmacia, 1986
pB-8 Deininger, 1981
(blur-8, Alu-DNA)

1.4 DNA

λ -DNA Pharmacia, Freiburg
diente als Längenstandard:

Fragmente in kb nach Spaltung mit HindIII : 23.7, 9.46, 6.67, 4.46, 2.25, 1.96, 0.59, 0.1

Fragmente in kb nach Spaltung mit HindIII/EcoRI : 21.22,
5.15, 4.97, 4.27, 3.53, 2.02, 1.9, 1.58, 1.33, 0.983,
0.831, 0.564, 0.125

E. coli DNA Pharmacia, Freiburg

Lachs Sperma DNA Sigma, Deisenhofen

Die cDNA-Klone piti und miciti wurden von T. Schreitmüller (Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik Innenstadt in München) zur Verfügung gestellt:

piti: 2260 bp der H-Ketten cDNA in pTz 19 R subklo-
niert

miciti: 952 bp der L-Ketten cDNA in pTz subkloniert

1.5 Chemikalien

Adenosin-5' triphosphat	Boehringer, Mannheim
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco, Detroit
Bacto-Trypton	Difco, Detroit
Bovinseryumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Cäsiumchlorid	BRL, Eggenstein
Deoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	Boehringer, Mannheim
Dextranblau	Pharmacia, Freiburg
Dextran	Pharmacia Fine Chemicals, Upsalla Schweden
Dithiotreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
EDTA (Titriplex III)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr)	Boehringer, Mannheim
Ficoll 400000	Pharmacia, Freiburg
Gelatine	Merck, Darmstadt
D-Glucose	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Isopaque (75% Metrizoatlösung)	Nyegaard & Co, Oslo, Norwegen
D-Maltose	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol (β -Met)	Fluka, Neu Ulm
Natriumdodecylsulfat SDS	Serva, Neu Ulm
Nonidet NP 40	Sigma, Deisenhofen
Phenol	Merck, Darmstadt
Polyethylenglycol 6000 (PEG)	Serva, Heidelberg
Polyvinylpyrrolidon	Sigma, Deisenhofen
Putrescin	Serva, Neu Ulm
Sarcosyl	Serva, Neu Ulm
Sephadex G 50 DNA Grade	Pharmacia, Freiburg
Spermidin	Serva, Heidelberg
Triton X 100	Serva, Neu Ulm

Alle weiteren Chemikalien wurden von der Fa. Merck, Darmstadt oder Fa. Sigma, Deisenhofen in p. a.-Qualität bezogen.

Aqua bidest wurde über ein Seral Reinstwasser-System gewonnen (Fa. Alhäuser, Ransbach-Baumbach).

1.6 Antibiotika

Ampicillin
Chloramphenicol

Boehringer, Mannheim
Sigma, Heidelberg

1.7 Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionsenzyme wurden von der Firma Boehringer (Mannheim), Biolabs (Schwalbach) oder BRL (Eggenstein) bezogen.

1.8 Sonstige Enzyme

Alkalische Phosphatase aus
Kälberdarm
T4-DNA Ligase
E.coli DNA Polymerase I
DNase I
Proteinase K
RNase A
DNase I
Lysozym

Boehringer, Mannheim
Biolabs, Schwalbach
Boehringer, Mannheim
Worthington
Boehringer, Mannheim
Boehringer, Mannheim
Boehringer, Mannheim
Serva, Heidelberg

1.9 Radiochemikalien

alpha (^{32}P)-dCTP

Amersham, Braunschweig

1.10 Sonstiges Material

Dialyseschläuche Visking
Entwickler D 19
Film Type 667
Fixierer Unifix
Küvetten

Biomol, Ilvesheim
Kodak, Rochester USA
Polaroid, Offenbach
Kodak, Rochester USA
Sarstedt, Nümbrecht-
Rommelsdorf

Nitrocellulose-Mem-

branfilter (Durchmesser 13.7 cm, 8.2 cm und 24.5x24.5 cm, jeweils 0.45 um Porengröße)	Schleicher&Schüll, Dassel
Papier 3MM	Whatman, England
Petrischalen (24.5x24.5 cm)	Sarstedt, Nümbrecht- Rommelsdorf
Röntgenfilme (X-Omat AR 35x43 cm)	Kodak, Rochester USA
Sterilfilter (Millex GS 0.22 um Porengröße)	Millipore, Eschborn

1.11 Medien und Puffer

LB (auf 1l)	10 g Bactotrypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl
LB-Platten	LB-Medium 1.5% Difco Agar
LB-Weichagarose	LB-Medium 0.7% Seakem Agarose
LB-Weichagar	LB-Medium 0.7% Difco Agar

Den Selektivnährlösungen bzw.-nährböden wurden, wo angegeben, an Antibiotika Ampicillin (30 ug/ml) oder Chloramphenicol (170 ug/ml) zugesetzt.

Phagenpuffer	100 mM NaCl 10 mM Tris/HCl pH 7.5 10 mM MgCl ₂
SM	100 mM NaCl 9 mM MgCl ₂ ·7H ₂ O 50 mM Tris/HCl pH 7.5 2% v/v Gelatine
20xSSC auf 5l:	875 g NaCl 441 g Natriumcitrat

TE-Puffer

10mM Tris
1mM EDTA pH 8.0

Tris-Acetat-Puffer (TAE)

40 mM Trisacetat
2 mM EDTA pH 8.0

für die Agarose-Gelelektrophorese mit 0.5 ug/ml EtBr versetzt

Tris-Borat-Puffer (TBE)

89 mM Trisborat
89 mM Borsäure
2 mM EDTA pH 8.0

wie TAE für die Agarose-Gelelektrophorese mit 0.5 ug/ml EtBr versetzt

Alle weiteren Puffer sind im Methodenteil angegeben.

Phenol:

mit TE Puffer gesättigtes Phenol
pH 8.0 mit 1mg/ml 8-Hydroxychinolin

Chloroform:

Chloroform:Isoamylalkohol= 24:1

Phenol/Chloroform:

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol =
25:24:1

1.12 Geräte

- Mikrobiologische Techniken

Zentrifuge Centrikon H-401 (Kontron, Eching)

Zentrifuge Centrikon F 2055 (Kontron, Eching)

Sterile Arbeitsbank Typ Uniflow Biohazard UVUB 1200 (Uni Equip, München)

Autoclav Secfroid Modell HST 300 (Zirbus, Osterode)

Tisch Universalschüttler Tu-1 mit Inkubationshaube ITH-1
(B. Braun, Melsungen)

Präzisionsbrutschrank Typ B 5060 E (Heraeus, Hanau)

Spektralphotometer Typ Eppendorf (Netheler & Hinz,
Hamburg)

Mikrowellenherd Typ R-6200 (Sharp, Hamburg)

UV Schirm 302 nm Chroma K3 (Bachhofer, Reutlingen)

- Agarose-Elektrophorese

Gel-Elektrophorese-Apparat GNA-100 (Pharmacia, Freiburg)

Gel-Elektrophorese-Apparat Modell H4 (BRL, Eggenstein)

Spannungsgerät Power Supply Modell 100 (BRL, Eggenstein)

Spannungsgerät Biotec E554 (Fischer, Reiskirchen)

Vielzweck Land-Camera MP4 (Polaroid, Rochester USA)

- Weitere Geräte

Tischzentrifuge Typ 5414 S (Eppendorf, Hamburg)

Hybridisierungssofen Typ 3011-SO (Bachhofer, Reutlingen)

Sonifier Branson B-12 (Heinemann, Schwäbisch Gmünd)

Fraktionssammler ULTRORAC R (LKB, München)

pH-Meter 12S (Pusl, München)

Computer QX10, Plotter HI-80 (Epson, Düsseldorf)

Wasserbad Typ Exatherm U3 electronic (Julabo Labor-
technik, Seelbach)

2 Methoden

2.1 DNA-Isolierungen

2.1.1 Isolierung hochmolekularer DNA (Gatreau et al., 1983)

40ml Isopaque (32.8% v/v)/Dextranlösung (6% w/v) im Verhältnis 1:2) wurden mit 100 ml humanem Citratblut (1/10 Volumen 3.8% w/v Natriumcitrat) vorsichtig überschichtet. Innerhalb von 3-4h bei RT sedimentieren dabei die durch Dextran aggregierten Erythrozyten, während die Leukozyten über der durch Isopaque gebildeten Grenzschicht bleiben. Nach Dekantieren des Plasmas wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3000 rpm, 10 Min., 4°C, AS4.7 Rotor) sedimentiert. Die Lyse der Erythrozyten erfolgte durch einen hypotonen Schock: Der Niederschlag wurde mit 1/10 Volumen NaCl-Lösung (0.9% w/v) versetzt und nach Zufügen von 6 Teilen Wasser 50 Sekunden kräftig geschüttelt. Nach Zugabe von 3 Teilen NaCl-Lösung (3.6% w/v), Mischen und Zentrifugieren (1400 rpm, 10 Min., 4°C, AS4.7 Rotor) wurden die Zellen pelletiert. Der Niederschlag wurde wiederholt wie oben behandelt mit Ausnahme einer geringeren Menge an zugegebener NaCl-Lösung (1/20 Volumen). Nach Zentrifugieren (2500 rpm, 10 Min., 4°C, AS4.7 Rotor) wurden die Leukozyten sedimentiert und in 10 ml Puffer (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 7.4) resuspendiert. Durch tropfenweises Einlassen in 15 ml desselben Puffers, der zusätzlich SDS (1% w/v) und Proteinase K (100 ug/ml) enthielt, wurden die Zellen lysiert und anschließend in einem Schüttler bei 100 rpm üN bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde zweimal mit Phenol/Chloroform (1:3) extrahiert und anschließend zentrifugiert (3500 rpm, 10 Min., 20°C, AS4.7 Rotor). Die wässrige Phase wurde üN gegen ein 1000-faches Volumen an Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM NaCl) bei 4°C dialysiert (Die Dialyseschläuche waren zuvor 20 Min. in 10 mM Tris/HCl pH 8.0 und 10 mM EDTA gekocht worden). Nach RNasebehandlung (30 Min. hitzebehandelt; 100 ug/ml, 1h, 37°C) wurde diese durch Proteinase K (100 ug/ml; 1h, 37°C) inaktiviert. Die DNA wurde zweimal mit Phenol/Chloroform (1:3) extrahiert und gegen ein 1000-faches Volumen an TE Puffer mit zweimaligem Pufferwechsel dialysiert (Dialyseschläuche waren

wie oben beschrieben präpariert worden). Anschließend wurde mit Ammoniumacetat auf eine Endkonzentration von 2 M eingestellt, 2 Volumen Äthanol hinzugefügt und die DNA 24h bei -20°C gefällt. Durch Zentrifugation (16 000 g, 16 $^{\circ}\text{C}$, 45 Min.) wurde die DNA pelletiert und anschließend 36h bei 4°C in TE Puffer gelöst.

2.1.2 Präparative Isolierung und Schnellpräparation von Lambda-DNA

(a) Präparative Isolierung

Zur Infektion wurden 1.2 ml einer frischen Übernachtskultur ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 2$) von Q359 bzw. WL87 Bakterien mit 2×10^5 Phagenplaques (Q359) bzw. 1.5×10^5 Phagenplaques (WL87) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend in 50 ml Agarose (0.7%, 50°C) auf der Plattenoberfläche (24.5x24.5 cm) gleichmäßig verteilt. Nach Wachstum bei 37°C üN und Lyse der Bakterien wurden die Platten mit je 30 ml LB-Medium überschichtet und 2h bei RT geschüttelt (80 rpm). Das überstehende Phagenlysat wurde aufgenommen, mit jeweils 10 ml LB-Medium nachgewaschen und nach Zusatz von 2 ml Chloroform pro 500 ml Phagenlysat zur Abtrennung der Bakterien zentrifugiert (6500 rpm, 10 Min., 4°C , A6.9 Rotor). Der Überstand wurde nach Zusatz von RNase A (1 $\mu\text{g/ml}$) und DNase I (1 $\mu\text{g/ml}$) 2h geschüttelt (100 rpm). Noch nicht abgetrennte Bakterienzelltrümmer wurden abzentrifugiert (6500 rpm, 10 Min., 4°C , A6.9 Rotor) und die Phagen üN gefällt (100 g PEG 6000/l Phagenlösung, 1 M NaCl). Nach Pelletieren (9000 rpm, 15 Min., 4°C , A6.9 Rotor) wurden sie in 1/25 Volumen Phagenpuffer suspendiert und nach Zusatz von CsCl (0.5 g/ml) über einen Cäsiumchlorid-Stufengradienten (Dichte: 1.7 g/ml, 1.5 g/ml und 1.45 g/ml) gereinigt (25.000 rpm, 20°C , 4h, TST28.38 Rotor). Die blau fluoreszierenden Phagenbanden an der Dichtegrenze 1.5 g/ml und 1.45 g/ml wurden mit einer Injektionsnadel abgezogen und über einen Cäsiumchlorid-Gleichgewichtsgradienten (Dichte 1.5 g/ml) weitgehend von RNA und Proteinen befreit (35.000 rpm, 20°C , 24h, Ti50 Rotor). Zur Entfernung des CsCl wurden die Phagen üN unter mehrfachem Pufferwechsel

gegen das 1000-fache Volumen an TE Puffer dialysiert (Die Dialyseschläuche waren 10 Min. in TE Puffer gekocht worden).

Die Phagenhüllen wurden in 20 mM EDTA Lösung mit Zusatz von Proteinase K (50 µg/ml) und SDS (0.5% w/v) während 1h Inkubation bei 65°C aufgebrochen. Die DNA wurde je zweimal mit Phenol und Chloroform extrahiert und üN gegen das 1000-fache Volumen an TE-Puffer unter mehrfachem Pufferwechsel dialysiert (Die Dialyseschläuche waren zuvor 10 Min. in 100 mM EDTA pH 7.4 gekocht worden). Nach Butanol- und Chloroformextraktion wurde die DNA mit 2.5 Volumen Äthanol und Natriumacetat (2.5 M) üN bei -20°C gefällt. Durch Zentrifugation 30 Minuten bei 12 000 g wurde die DNA pelletiert und in TE Puffer gelöst.

(b) Schnellpräparation nach Cameron et al.(1977)

Nach dieser Methode konnte DNA innerhalb von zwei Tagen isoliert werden.

Ein frisches Plattenlysate wurde mit 4 ml einer kalten 20 mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM MgSO₄ Lösung überschichtet und bei 4°C üN inkubiert. Zu der Phagensuspension wurde ein Tropfen Chloroform gegeben. Die Bakterientrümmern wurden bei 9800 g abzentrifugiert. Ein Gemisch aus 800 µl Überstand und 160 µl 'SDS'-Mix (0.25 M EDTA, 0.5 M Tris/HCl pH 9.0, 25 mg/ml SDS) wurde 30 Min. bei 68°C inkubiert und danach bei 4°C abgekühlt. Die Zugabe von 200 µl einer 8 M Kaliumacetat Lösung diente zur Ausfällung von SDS-Protein Komplexen. Sie wurden nach 15 Min. bei 4°C abzentrifugiert (9800g, 30 Min. und 5 Min.). Die DNA im Überstand wurde zweimal mit 2.5 Volumen Äthanol und Natriumacetat (2.5 M) gefällt (30 Minuten -70°C) und anschließend in TE-Puffer aufgenommen.

2.1.3 Präparative Isolierung und Schnellpräparation von Plasmid DNA

(a) Präparative Isolierung von Plasmid DNA

LB-Medium (800 ml) mit Chloramphenicol (70 µg/ml) wurde mit 5 ml einer Übernachtskultur plasmidhaltiger E. coli Bakterien angeimpft und bei 37°C 150 rpm geschüttelt bis die logarithmische Wachstumsphase ($OD_{600nm} = 0.6$) erreicht war. Durch Chloramphenicolzugabe (Endkonzentration 170 µg/ml) wurde die chromosomale Replikation gestoppt und die Amplifizierung des Plasmids bei 37°C üN fortgesetzt. Im Anschluß daran war folgende Reihe von Arbeitsvorschriften notwendig: Abzentrifugieren der Bakterien (6500 rpm, 10 Min., 4°C, A6.9 Rotor); Resuspendieren des Sedimentes in 10 ml eiskalter Sucroslösung (25% w/v; 50 mM Tris/HCl pH 8.0 bei 37°C); Zugabe von 5 ml frischer LysozymbLösung (5 mg/ml; 50 mM Tris/HCl pH 8.0); 30 Min. Inkubation bei 37°C; Zugabe von 5 ml EDTA (0.2 M pH 7.4); 30 Min. Inkubation auf Eis; Zugabe von Nonidet P40 (1.5% v/v; 50 mM Tris/HCl pH 8.0) auf 0.3% v/v; 15 Min. Inkubation auf Eis; Zentrifugieren (18.000 rpm, 1h, 0°C, A8.24 Rotor) zur groben Trennung von Bakterientrümmern und chromosomaler DNA. Die Plasmid DNA aus dem klaren Überstand wurde anschließend in einem CsCl-Gleichgewichtsgradienten (1 g Cäsiumchlorid/ml, 125 µg EtBr) durch Zentrifugation (45 000 rpm, 36h, 18°C, vTI60) von der restlichen chromosomalen DNA sowie von genickt circularer Plasmid DNA (obere Bande) gereinigt. Die untere Bande, die die geschlossen circulaire Form der Plasmid DNA enthielt, wurde mit einer Injektionsnadel und daran befestigter Spritze abgezogen.

Zur Entfernung des Ethidiumbromids wurde zwei bis dreimal mit wassergesättigtem Butanol ausgeschüttelt und anschließend üN unter mehrfachem Pufferwechsel gegen 1xTE dialysiert (Der Dialyseschlauch war 20 Min. in 10 mM EDTA pH 7.4 gekocht worden). Nach Butanolextraktion wurde die DNA einmal mit Chloroform und zweimal mit Phenol extrahiert und nach Zugabe von Ammoniumacetat (Endkonzentration 2 M) mit 2 Volumen Äthanol 30 Minuten bei -70°C gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (12 000 g, 20 Min., 16°C) pelletiert und nach Vakuumtrochsen (Exsikator) in TE Puffer gelöst.

(b) Schnellpräparation von Plasmid DNA modifiziert nach Birnboim & Doly (1979)

Nach Wachstum der plasmidhaltigen Bakterien in 10 ml Kulturen (mind. 150 rpm, 12h, 37°C) wurden die Zellen abzentrifugiert (4000 rpm, 10 Min., 4°C, AS4.7 Rotor), das Pellet in 200 µl frisch zubereitetem Lysozymmix (2 mg Lysozym/ml; 50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl pH 8.8) resuspendiert und 30 Minuten bei RT stehengelassen. Nach Zufügen von 400 µl alkalischer SDS-Lösung (1% w/v SDS; 2.2 M NaOH) wurde vorsichtig geschüttelt, anschließend 3 M Na-Acetat hinzupipettiert (300 µl, pH 4.8), gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension zentrifugiert (12 000 g, 15 Min., 4°C). Der Überstand wurde zweimal mit Phenol extrahiert (Phenol/Chloroform 1:1), mit 2 Volumen Äthanol und Ammoniumacetat (2 M) gefällt und das Pellet in 205 µl RNase Puffer (4 ml TE Puffer, 200 µl RNase A, 3 µl RNase T1) für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Nach Zufügen von 80 µl 3 M Na-Acetat pH 4.8 und 260 µl Wasser wurde die DNA zweimal mit Phenol- und einmal mit Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde auf 2 M Ammoniumacetat eingestellt und die DNA durch Zugabe von 2.5 Volumen Äthanol gefällt (30 Min. -70°C). Anschließend wurde die DNA 30 Minuten bei 12 000 g und 16°C pelletiert, im Exsikator getrocknet und in 40 µl TE Puffer pH 7.5 gelöst.

2.2 Bestimmung der optischen Dichte

Zur Bestimmung von Reinheit und Konzentration der Nukleinsäuren wurde die optische Dichte der DNA Lösung bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Als Reinheitskriterium für Nukleinsäuren diente der Quotient A_{260}/A_{280} , der zwischen 1.8 und 2.0 liegen sollte. Als Richtwert für die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde die nachfolgend aufgeführte Konzentration benutzt.

DNA, doppelsträngig $1A_{260}\text{-E/ml} = 50 \text{ µg/ml}$

Das Zellwachstum einer Bakterienkultur wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt. Als Richtwert diente nachfolgende Angabe:

$$1 \text{ OD}_{600\text{nm}} = 8 \times 10^8 \text{ Zellen/ml}$$

2.3 Verdauung mit Restriktionsendonukleasen

Ein typischer Spaltansatz enthielt 0.2-1 µg DNA, 1U (bei chromosomaler DNA 4 Enzymeinheiten) des entsprechenden Restriktionsenzym sowie 1/10 Volumen an 10-fach konzentriertem Verdauungspuffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Für den Enzymverdau wurde der jeweils vom Hersteller empfohlene Inkubationspuffer verwendet.

Bei einem Doppelverdau wurde zuerst mit dem Enzym verdaut, das die niedrigere Salzkonzentration benötigt. Nach Beendigung der Reaktion und Inaktivierung des Enzyms (5 Min., 68°C) wurde die zusätzliche Salzmenge ergänzt und mit der zweiten Restriktionsendonuklease weiterverdaut.

Eine komplette Hydrolyse durch die Restriktionsendonuklease wurde gewöhnlich nach 1-2h Inkubation bei 37°C erreicht. Die endonukleolytische Spaltung der DNA wurde gelelektrophoretisch analysiert. Anschließend wurde das Enzym durch Hitze inaktiviert (5 Min. bei 68°C) und der Reaktionsansatz bis zur Weiterverwendung auf Eis gestellt.

Sollte die gespaltene DNA anschließend in eine Ligierungsreaktion eingehen, wurde eine Inkubationszeit mit der Restriktionsendonuklease von maximal 1h eingehalten, um die in den Restriktionsendonukleasen enthaltenen Exonukleaseaktivitäten möglichst gering zu halten.

2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Durch Elektrophorese mittels 0.45-1.5% w/v Agarosegelen wurden DNA-Fragmente von 0.2 -50 kb gut aufgetrennt. Diese Methode ermöglichte u.a. eine Größenabschätzung hydrolysierter Phagen- DNA zur Erstellung einer Restriktionskarte. Als Längenstandard wurden für den Bereich 0.5-23 kb HindIII sowie HindIII/EcoRI verdaut Lambda DNA verwendet. Für analytische Gele wurde Tris-Acetat-Puffer (TAE), für präparative Gele im Falle nachfolgender Elektroelution oder Fragmentisolierung über DE 81 Papier Tris-Borat-Puffer (TBE) verwendet. Die jeweilige Agarosemenge wurde 4 Min. in Puffer gekocht (Mikrowellenherd) und anschließend mit EtBr bis zu einer Endkonzentration von 0.5 µg/ml versetzt. Nach Abkühlen bei Raumtemperatur bis auf 50°C wurde das Gel in eine horizontale Gelapparatur gegossen und zur vollständigen Polymerisierung je nach Größe des Gels 1-2h stehengelassen. Vor dem Auftragen wurde Phagen-DNA 10 Minuten auf 68°C erhitzt und mit 1/10 Volumen Sucrose-Bromphenolblaulösung (10x=0.5 g/ml Sucrose, 3.7 mg/ml EDTA pH 8.0, 0.18 g/ml Harnstoff, 2.5 mg/ml Bromphenolblau) gemischt.

Für analytische Zwecke wurden in der Regel 0.5-1 µg Plasmid- oder Phagen DNA pro Tasche (1.5x1x3 mm) aufgetragen. Für die Restriktionskartierung der Phagen-DNA auf 1.2% Agarosegelen wurde mindestens die doppelte DNA-Menge pro Tasche (0.5x0.1x0.4 cm) eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung wurde unter UV verfolgt und photographisch (Polaroidfilme) festgehalten.

2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten

2.5.1 Elektroelution

Nach präparativer Agarosegelelektrophorese (E 2.4) wurden die gewünschten DNA Banden unter langwelligem UV (360 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten und in einen 10 Minuten in 10 mM EDTA pH 8.0 gekochten Dialyseschlauch eingeführt, der mit einer möglichst geringen Menge (1-2 ml) an Tris-Acetat Puffer luftblasenfrei gefüllt wurde, sodaß das Gelstück in beständigem Kontakt mit dem Puffer war.

Der Schlauch war an beiden Enden durch Knoten verschlossen.

Der Dialyseschlauch wurde rechtwinklig zur Stromflußrichtung in eine Elektrophoresekammer gelegt und so durch weitere Elektrophorese die DNA aus dem Gel eluiert (gewöhnlich 100 V, 2-3h). Nach der Elektroelution befand sich die DNA in Lösung an der inneren Wandseite des Dialyseschlauches auf der Seite des Pluspoles. Durch Umpolen der Stromstärke (100 V, 2 Min.) wurde die DNA von der Wand abgelöst und anschließend zusammen mit dem Puffer mit einer Pasteurpipette in ein Reaktionsgefäß überführt. Um Agarosereste aus der DNA Lösung abzutrennen, die bei späteren enzymatischen Reaktionen stören könnten, wurde die DNA Lösung nun mit dem gleichem Volumen TE gesättigtem Phenol ausgeschüttelt, während der Phasenmischung in flüssigem Stickstoff eingefroren und sofort zentrifugiert (12 000 g, 5 Min.). Das sich am Boden befindende kristalline Phenol enthielt die Agarosereste, es wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde 3-4 mal wiederholt, anschließend wurde die DNA zweimal mit Chloroform ausgeschüttelt und nach Zusatz von Ammoniumacetat (2.5 M) mit zwei Volumen Äthanol während 30 Minuten Inkubation bei -70°C gefällt. Nach Zentrifugieren (12 000 g, 30 Min.) wurde das Pellet im Exsikator getrocknet und danach in TE Puffer gelöst.

2.5.2 Isolierung von DNA Fragmenten mit DE 81 Papier

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente (2.4) in Tris-Borat-Puffer wurden die zu eluierenden DNA Fragmente unter langwelligem UV (360 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten und senkrecht zur Stromrichtung in die Rinne eines zweiten 1% igen Agarosegels gelegt. Vor das Gelstück auf der Seite des Pluspoles wurde ein schmaler Streifen Whatman DE 81 Papier in Größe des herausgeschnittenen DNA Fragmentes geklemmt. Durch Elektrophorese wurde die DNA aus dem Gelstückchen eluiert und an das DE 81 Papier adsorbiert.

Die unter UV auf dem DE 81-Papier stark fluoreszierende DNA- Bande wurde exakt herausgeschnitten und in einem

Reaktionsgefäß dreimal mit jeweils 200 µl Waschpuffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 7.2, 100mM LiCl) unter Kühlung auf Eis gespült. Nach Zugabe von 100µl Elutionspuffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 7.2, 1 mM LiCl, 20% Ethanol abs.) und 30 Min. Inkubation bei RT wurde die DNA-Lösung zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und unter Kühlung auf Eis weiterer Elutionspuffer (200 µl) zupipettiert. Anschließend wurde das Filterstückchen dreimal mit der gleichen Menge an Eluatpuffer durchgespült und dieser mit der auf Eis gehaltenen DNA Lösung vereint. Die DNA wurde zweimal mit Phenol, einmal mit Chloroform ausgeschüttelt, mit 2 Volumen Äthanol und Ammoniumacetat (2 M) 2h bei -20°C gefällt, 30 Minuten bei 12 000 g zentrifugiert und nach dem Trocknen in TE Puffer aufgenommen.

2.6 Transfer von DNA auf Nitrocellulosefilter

2.6.1 Southern Blot, Sandwichblot (Southern, 1975)

Die gespaltene DNA wurde zunächst durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Bandenpositionen der mit EtBr gefärbten Längenstandard DNA wurden unter UV Licht durch Punktieren mit einer Pasteurpipette markiert. Die DNA im Gel wurde in situ einer milden Säurebehandlung (2x 15 Min., 0.25 M HCl) unterzogen. Dann wurde die DNA denaturiert (2x 20 Min. 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl), neutralisiert (zweimal 20 Min. 0.5 M Tris/HCl pH 7.4, 1.5 M NaCl) und das Gel 10 Minuten in 20xSSC gelegt. Die DNA wurde nun mit 20xSSC ca. 20 Stunden lang auf einen Nitrocellulosefilter übertragen. Als Ansaugpapier wurde Zellstoff verwendet. Dieser wurde während des Transfer mehrmals gewechselt. Der Nitrocellulosefilter wurde 1 Minute in 2xSSC gelegt und bei RT getrocknet. Unter UV-Licht konnten die markierten Positionen der Längenstandard DNA auf dem Filter erkannt und angezeichnet werden. Der Filter wurde ca. 3h im Vakuum bei 80°C gebacken.

Um die elektrophoretisch aufgetrennte DNA gleichzeitig mit zwei verschiedenen Sonden hybridisieren zu können, wurde je ein Nitrocellulosefilter auf bzw. unter das

Agarosegel gelegt. Nach Blotten üN war die DNA auf beiden Filtern identisch fixiert (Sandwichblot).

2.6.2 Plaqueblot (Benton & Davis, 1977)

Phagen wurden auf Weichagarose ausplattiert, sodaß weitgehend alle Plaques vereinzelt vorlagen. Wenn die Plaques ihre Maximalgröße erreicht hatten (üN), wurden die Platten 30 Minuten bei 4°C kaltgestellt. Zwei Nitrocellulosefilter (A, B), in Größe und Format den Platten entsprechend, wurden übereinander auf eine Platte gelegt. Um ihre Lage zu bestimmen wurden Filter und Agarose mit einer Nadel mehrmals durchstochen. Nach erneutem Kaltstellen für 30 Minuten wurden die Filter nacheinander abgenommen, denaturiert (2.5 Min., 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl), neutralisiert (5 Min., 1 M Tris/HCl pH 7.4, 1.5 M NaCl und 0.5 M Tris/HCl pH 7.4, 1.5 M NaCl) und 3h im Vakuum bei 80°C gebacken.

2.7 Hybridisierung

2.7.1 Radioaktive Markierung von DNA durch Nick-Translation (Rigby et al., 1977)

Mittels Nick-Translation wurde doppelsträngige DNA mit ³²P-dCTP zu hoher spezifischer Radioaktivität markiert. Es wurden dafür ausschließlich durch präparative Agarosegelelektrophorese gereinigte DNA-Fragmente eingesetzt. Für die Reaktion wurden folgende Lösungen pipettiert:

1-5 ul DNA (0.2-0.5 ug)
 2.5 ul 10-fach NT-Puffer
 0.8 ul 1 mM dATP
 0.8 ul 1 mM dGTP
 0.8 ul 1 mM dTTP
 10 ul (=100 uCi) alpha-(³²P)-dCTP (3000 Ci/mmol)
 2.5 ul 4 U/ul E. coli DNA-Polymerase I
 0.5 ul 50 pg/ul DNaseI

mit Wasser auf 25 ul Gesamtvolumen ergänzt

Das Reaktionsgemisch wurde 2-3h bei 14°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 5 ul NT-Stopplösung (5% w/v SDS, 50 mM EDTA pH 7.8) gestoppt.

Die Abtrennung der radioaktiv markierten DNA von freien Desoxynukleosidtriphosphaten erfolgte durch Sephadex G-50 Gelfiltration.

2.7.2 Hybridisierung von DNA mit DNA

Die Filter (E 2.6.1 und 2.6.2) wurden in etwa gleich großen hitzebeständigen Kunststoffschalen bei 68°C in folgender Lösung vorhybridisiert: 5xSSC, 0.02% (w/v) BSA, 0.02% (w/v) Ficoll, 0.02% (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 0.05% (w/v) SDS, 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA (Denhardt, 1966); außerdem denaturierte (5 Min. 100°C)-Lachssperma DNA (200 ug/ml), die durch Ultraschallbehandlung auf eine durchschnittliche Länge von 300 bp reduziert worden war. Nach 1h wurde die Lösung ausgetauscht durch eine entsprechende Lösung, die zusätzlich 2×10^6 cpm/ml hitzedenaturierte, nicktranslatierte DNA (E 2.7.1) enthielt. Nach Hybridisierung für 24-36h wurden die Filter unter häufigem Wechseln in 2xSSC, 0.5% (w/v) SDS bei RT und dann zweimal 15 Min. in 0.1xSSC, 0.1% (w/v) SDS bei 68°C (stringente Bedingungen) gewaschen. Sie wurden bei RT getrocknet und bei -80°C autoradiographiert.

2.8 Herstellung von Bakterienkulturen

100 ml LB-Medium (10 mM MgSO_4 , 0.2% Maltose) wurden mit 5 ml Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien wurden unter Schütteln (150 rpm) bei 37°C bis zum Erreichen einer $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1.2$ vermehrt. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Zellen bei 4°C abzentrifugiert (5000 rpm, 10 Minuten, 4°C, AS4.7 Rotor). Das Pellet wurde in 10 mM MgSO_4 (100 ml) resuspendiert, 1h bei 37°C weitergeschüttelt und anschließend erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 10 mM MgSO_4 so aufgenommen, daß eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 2 vorlag. Durch Lagerung bei 8°C sind sie bis zu drei Wochen lang verwendbar.

2.9 Dauerkulturen in Glycerin

5-10 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und ÜN bei 37°C unter Schütteln (150 rpm) inkubiert; 500 μl Bakterienzellen dieser Suspension wurden in sterilen Reaktionsgefäßen mit Glycerin (Endkonzentration 15% v/v) gemischt und sowohl bei -20°C (Kurzzeitlagerung) als auch -70°C (Langzeitlagerung) aufbewahrt.

2.10 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

500 ml LB-Medium wurden mit 1 ml Übernachtskultur des *E. coli* Bakterienstammes angeimpft und bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.6$ wachsen gelassen. Die Zellen wurden dann ca. 1h auf Eis gekühlt und anschließend abzentrifugiert (5600 rpm, 10 Min., 4°C, A6.9 Rotor).

Das Pellet wurde in 250 ml 50 mM CaCl resuspendiert, 45 Minuten auf Eis gehalten, erneut zentrifugiert und letztlich in 50 ml CaCl aufgenommen. Nach einstündiger Inkubation auf Eis wurde die Bakteriensuspension aliquotiert (15% v/v Glycerin), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -70°C aufbewahrt.

2.11 Transformation

Kompetente E. coli Zellen (-70°C , E 2.10) wurden auf Eis aufgetaut. Maximal 40 ng Plasmid DNA, die das Ampicillinresistenzgen als Selektionsmarker trägt, wurden mit Wasser auf 100 μl aufgefüllt, mit 200 μl Bakterienzellen gemischt, 5 Min. auf Eis stengelassen und anschließend 5 Min. bei 37°C und 80 rpm geschüttelt.

Nach Auffüllen mit LB-Medium auf 1 ml wurde im Falle der Ampicillinselektion weitere 30 Min. bei 37°C geschüttelt, um die Expression des Antibiotikumresistenzgens in Gang zu setzen.

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurde auf selektiven Agarmedien entsprechend ausplattiert (1 ng zur Transformation eingesetzte Plasmid DNA ließ im optimalen Fall 10^3 Kolonien erwarten). Die Anzahl resistenter Bakterienkolonien mußte innerhalb von 16h bestimmt werden, um die Bildung ampicillinsensitiver Satellitenkolonien so gering wie möglich zu halten.

2.12 Klonierung in Lambda Phagen

2.12.1 Herstellung der Vektorarme

EMBL4 Vektor DNA wurde komplett mit BamHI verdaut (E 2.3). Anschließend wurden durch 5-fachen Enzymüberschuß an SalI (10 Einheiten / μg DNA) die beiden randständigen Enden sowie das kleine mittlere Fragment des Stuffers entfernt und so die Religierung mit den beiden Vektorarmen verhindert.

EMBL3 Vektor DNA wurde entsprechend zunächst mit BamHI und anschließend mit 10-fachem Überschuß an EcoRI (10 Einheiten/ μg DNA) geschnitten.

Die gespaltene DNA wurde zweimal mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumen Isopropanol bei -20°C mindestens 2h präzipitiert. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 12 000 g wurde das Pellet im Exsikator vakuumgetrocknet und in TE Puffer bis zu einer Konzentration von 0.2-0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gelöst.

2.12.2 Partialverdau von genomischer DNA mit verschiedenen Enzymkonzentrationen

10 ug chromosomale DNA wurden mit Enzymverdauungspuffer in einem Endvolumen von 150 ul gelöst, gut durchmischt und auf 9 Reaktionsgefäße verteilt (Gefäß 1 30 ul, Gefäß 2-9 jeweils 15 ul). 4 Enzymeinheiten MboI wurden in Gefäß 1 gegeben, vermischt und anschließend 15 ul dieses Reaktionsansatzes in Gefäß 2 überführt. Nach Durchmischen wurde die serienmäßige Enzymverdünnung bis zu Gefäß 8 fortgeführt. Die Reaktionsgefäße wurden 1h bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 20 mM) und Inkubation auf Eis wurde die Reaktion gestoppt. Die Spaltung der DNA wurde auf einem 0.4% Agarosegel analysiert. Als Marker diente Lambda DNA mit HindIII geschnitten. Die optimale Enzymkonzentration konnte anhand der stärksten Fluoreszenzintensität im Größenbereich von 12-23 kb ermittelt werden. Für die Genbankkonstruktion wurden zusätzlich die nächstgeringere sowie nächsthöhere Enzymkonzentration verwendet.

2.12.3 Größenfraktionierung der mit MboI partial verdauten chromosomalen DNA durch Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation

100-400 ug mit MboI partial verdaute chromosomale DNA (E 2.12.2) wurde 10 Min. auf 68°C erhitzt und nach Abkühlen auf 20°C vorsichtig auf 38 ml eines 10-40%igen Sucrosegradienten (Sucrose in 1 M NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 8.0, 5 mM EDTA) geschichtet. Die Fragmente wurden durch Zentrifugieren (26.000 rpm, 24h, 20°C, TST28.38 Rotor) der Größe nach getrennt. Nach der Zentrifugation wurde das Röhrchen in ein Stativ eingespannt und seitlich am Boden mit einer Injektionsnadel angestochen, an deren hinterem Ende ein Gummischlauch angebracht war, welcher zu einem Fraktionssammler (LKB) führte. Es wurden Fraktionen zu 0.5 ml ausgetropft. Aliquots jeder zweiten Fraktion (12 ul) wurden mit gleichem Volumen Wasser ergänzt und die Größe der gepoolten Fragmente anschließend gelelektrophoretisch untersucht. Als Marker diente Lambda DNA mit HindIII hydrolysiert. Fraktionen, deren Fragmentgrößen im

Bereich zwischen 12-23 kb lagen, wurden gepoolt. Zur Entfernung der Sucrose wurde 12h bei 4°C gegen TE-Puffer dialysiert (zweimaliger Pufferwechsel; Die Dialyseschläuche wurden zuvor 20 Minuten in 10 mM Tris HCl pH 7.4 und 100 mM EDTA gekocht). Nach Volumeneinengung mit wassergesättigtem Butanol auf maximal 2 ml wurde die DNA mit 2 Volumen  thanol und 2 M Ammoniumacetat  N bei 4°C gef llt und nach Zentrifugation (12 000 g, 40 Min.) und Trocknen des Pellets im Vakuum in TE Puffer bis zu einer Endkonzentration von 0.2 ug/ul gelöst.

2.12.4 5'-Dephosphorylierung

Um eine Selbstligation der in E 2.12.3 gepoolten Fraktionen zu vermeiden und somit die für eine optimale Ligierung in E 2.12.5 eingesetzte DNA Konzentration einzuhalten, wurden die 5'-Phosphatenden der linearen, gr  stfraktionierten Fragmente (E 2.12.3) durch alkalische K lberdarmphosphatase abgespalten. Die entsprechende DNA Lösung wurde mit H₂O 1:1 verdünnt, um die Salzkonzentration zu verringern und mit 5-10 U alkalischer Phosphatase für 1h bei 37°C inkubiert. Durch Zusatz von 1/10 Volumen 100 mM Nitriiloessigs ure (20 Min., 37°C) wurde das Enzym inaktiviert. Das Reaktionsgemisch wurde zur Entfernung des Proteins je zweimal mit Phenol und Chloroform extrahiert. Nach Zugabe von Natriumacetat auf 2.5 M und 2.5 Volumen  thanol wurde die DNA bei -70°C 20 Minuten gef llt, nach Zentrifugation (12 000 g, 30 Min.) im Exsikator vakuumgetrocknet und in TE Puffer gelöst.

2.12.5 Ligierung und Herstellung rekombinanter Phagen DNA

Ein typischer Ligierungsansatz enthielt 50-500 ng DNA in 1-3 ul Lösung, 0.5 ul 10-fach konzentrierter Biolabs-Ligasepuffer (10x= 500 mM Tris HCl pH 7.8, 100 mM MgCl₂, 200 mM DTT, 500 ug/mlBSA), 0.5 ul T4-Ligase (Biolabs)

sowie 0.5 μ l 10 mM ATP Lösung. Die Inkubation erfolgte bei 12°C üN.

Der Erfolg der Ligierungsreaktion konnte in den meisten Fällen durch gelelektrophoretische Auftrennung (E 2.4) überprüft werden.

Um eine möglichst hohe Effizienz an hybriden Phagen beim in vitro packaging (E 2.12.7) zu erhalten, wurden verschiedene Ligierungsverhältnisse von Vektor und Insert DNA für die Bildung konkatemerer DNA Moleküle ausgetestet. Für die Testligierung wurden die molaren Verhältnisse 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 und 1:1 (Arme : Inserts) untersucht und das optimale Ligierungsverhältnis anhand der Anzahl gewachsener Phagenplaques nach der in vitro Verpackung (E 2.12.7) der DNA bestimmt. Es lag bei einem 4-fach molarem Überschuß der Vektorarme (E 2.12.1) gegenüber der genomischen DNA (E 2.12.3) bei einer Endkonzentration von 170-200 μ g DNA/ml Ligierungsansatz.

2.12.6 Herstellung von Verpackungsextrakten

Für die Herstellung von Verpackungsextrakten kamen temperatursensitive lysogene Lambda Bakterienstämme (E.coli BHB2690 und E.coli BHB 2688) zur Verwendung, die in verschiedenen Schritten der Morphogenese defekt sind und somit die für das 'in vitro packaging' notwendigen leeren Phagenköpfe, -schwänze und Verpackungsfaktoren (Proteine) zur Verfügung stellen.

E.coli BHB 2690 trägt eine Amber Mutation im Gen D, dem Dekorationsprotein an der Außenseite des reifen Phagen, wodurch das Einfädeln der DNA sowie die anschließende Reifung des Kopfes verhindert wird und sich leere Vorläufer (Preheads) in der Bakterienzelle anhäufen.

E.coli BHB2688 besitzt einen Defekt im Gen E, dem Hauptstrukturprotein des Phagenkopfes, wodurch das Zusammenfügen der Phagenkopfkomponten verhindert wird und diese sich in freier Form anhäufen.

Beide Prophagen tragen außerdem eine Sam7 Mutation im Gen S, welche die vorzeitige Freisetzung dieser Phagenkomponenten unterbindet.

Vor Beginn der Extraktpräparation wurden die lysogenen E.coli Stämme BHB2688 und BHB2690 auf die Anwesenheit des temperatursensitiven Lambda Repressorgens und den $recA^-$ Phänotyp der Wirtsbakterien getestet. Keine der Subkulturen der beiden Bakterienstämme bildete nach 16h Inkubation bei 42°C üN Kolonien. Auch nach nur 10 Sek. Bestrahlung mit UV Licht (256 nm) zeigten die Stämme bei 32°C kein Wachstum (Kontrolle unbestrahlter BHB2688 und 2690).

2.12.6.1 Aufbrechen der E. coli Zellen durch Ultraschall (Ultraschallextrakt)

LB-Medium (250 ml) wurde mit 2 ml einer Übernachtskultur E.coli BHB2690 angeimpft und 2h bei 32°C geschüttelt. Die Induktion der Lysogene erfolgte unter Schwenken der Kolben in einem 45°C Wasserbad für 30 Min.. Die Inkubation wurde anschließend für 2-3h bei 39°C unter starkem Schütteln fortgesetzt. Die Lyse der Bakterien wurde durch Flockenbildung der Bakteriensuspension (1.5 ml) nach Zugabe von 1-2 Tropfen Chloroform nachgewiesen. Nach Abzentrifugieren der Bakterien (4500 rpm, 10 Min., 4°C, AS4.7 Rotor) wurde das gut abgetropfte Pellet in 3.6 ml frisch zubereitetem kalten Beschallungspuffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 5 mM β -MET) homogen resuspendiert. Die Zellen wurden 30 mal für jeweils 10 Sekunden mit Ultraschall (Branson) behandelt und abwechselnd mit Eiswasser gekühlt. Die Zelltrümmer wurden bei 12.000 rpm, 10 Min., 4°C, TST28.17 entfernt. Der Überstand wurde mit demselben Volumen Beschallungspuffer sowie 1/6 Volumen an frisch zubereitetem Verpackungspuffer (6 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM Spermidin, 50 mM Putrescin, 20 mM MgCl₂, 30 mM ATP, 30 mM β -MET) verdünnt. Je 15 μ l davon wurden in vorgekühlte Reaktionsgefäße (1.5 ml) pipettiert und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -70°C aufbewahrt.

2.12.6.2 Aufbrechen der Zellen durch Frieren und Tauen (Frier/Tau-Lysat)

LB-Medium (500 ml) wurde mit 2 ml $\bar{u}N$ Kultur E.coli BHB2688 angeimpft und bis zur Lyse der Bakterien analog E 2.12.6.1 weiterbehandelt. Die Bakterien wurden dann bei 4500 rpm 10 Min. 4°C AS4.7 Rotor pelletiert, in kalter, frisch zubereiteter Sucroslösung (10% w/v Sucrose; 50 mM Tris/HCl pH 8.0) ad 3 ml resuspendiert und in vorgekühlten 1.5 ml Reaktionsgefäßen zu je 0.5 ml aufgenommen. Durch Zufügen von jeweils 25 μ l frischer eiskalter LysozymbLösung (2 mg/ml Lysozym, 0.25 M Tris/HCl pH 8.0) wurden die Zellmembranen zerstört. Die Zellen wurden kurz in flüssigen Stickstoff getaucht und auf Eis langsam aufgetaut. Nach Zugabe von jeweils 25 μ l Verpackungspuffer wurden die Extrakte vereint, die Zelltrümmer abzentrifugiert (48.000 rpm, 1h, 4°C, TST28.17 Rotor) und der proteinhaltige Überstand in vorgekühlte Reaktionsgefäße zu 10 μ l portioniert.

2.12.7 In vitro Verpackung und Ausplattieren der rekombinanten Phagen

In Testansätzen wurden zunächst 10 μ l Phagen 'Frier/Tau Lysat' (E 2.9.6.2) zu 15 μ l noch gefrorenem 'Ultraschall-lysate' (E 2.9.6.1) gegeben. Anschließend wurde die Mischung 2h bei RT stehengelassen und danach 1 ml Phagenpuffer zugegeben. Die Phagen wurden mit Phagenpuffer verdünnt und zu 0.2 ml Bakterienübernachtskultur gegeben, die grundsätzlich am selben Tag gezüchtet worden war. Zur Adsorption wurde das Bakterien-Phagen-Gemisch 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Es wurden immer Doppelansätze durchgeführt. Als Kontrollansätze dienten Bakterien mit Extrakten ungeschnittener (nativer) und verdauter Lambda-DNA (Arme) sowie Bakterien ohne Phagen. Anschließend wurde auf Agarplatten ausplattiert. Als Richtwerte für die Güte der Extrakte galt: verpackte ungeschnittene DNA liefert 2×10^8 pfu/ μ g. Um das Verhältnis von rekombinanten zu nicht rekombinanten Phagen zu bestimmen, wurden die Phagen auf selektiven Stämmen (Q358 permissiver Wirt, Q359 restriktiver Wirt) ausplattiert. Die Differenz der

beiden Werte entsprach der Summe an nicht rekombinanten Phagen.

Für das Sichten der Phagen Genbanken wurden auf 20 Agarplatten (441 cm^2), die 300 ml LB Agar enthielten, jeweils 8×10^4 Lambda Phagen mit 35 ml Weichagarose und 1.2 ml Bakterienübernachtskultur (mit 10 mM MgSO_4 auf $\text{OD}_{600\text{nm}}=2$ eingestellt) ausplattiert. Für die EMBL4-Genbank wurden 1.0 μg Leukozyten DNA, für die EMBL3 Genbank 0.7 μg Leukozyten DNA mit 10 μl 'Frier/Tau-Lysat' und 15 μl 'Ultraschallsat' verpackt und titriert.

2.13 Phagenstammkulturen

200 μl einer Bakterienübernachtskultur, mit 10 mM MgSO_4 auf $\text{OD}_{600\text{nm}}=2$ verdünnt, wurden mit 10^5 pfu eines Phagenklones 20 Minuten bei 37°C zur Adsorption inkubiert, zu 5 ml Topagarose (0.7%; 50°C) hinzugegeben und sofort gleichmäßig über die Oberfläche einer 87 mm großen Agarpetrischale verteilt. Nach Lyse der Bakterien (ÜN bei 37°C) wurden die Platten mit jeweils 5 ml SM-Puffer überschichtet und 2h bei 4°C geschüttelt. Die Phagensuspension wurde dann mit einer Pasteurpipette abgezogen und die Platten mit je 1 ml SM nachgespült. Noch in der Phagenlösung vorhandene Bakterien wurden abzentrifugiert (5000 rpm, 10 Min., 4°C , AS4.7 Rotor) und die Phagensuspension bei 4°C im Kühlschrank (0.3% Chloroform) aufbewahrt.

Literatur

- Akerström B and Landin B (1985) Rat α_1 -microglobulin. Purification from urine and synthesis by hepatocyte monolayers. *Eur. J. Biochem.* 146, 353-358
- Albrecht GJ, Hochstrasser K and Salier JP (1983b) Elastase inhibition by the inter- α -trypsin inhibitor and derived inhibitors of man and cattle. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 364, 1703-1708
- Anderson S and Kingston IB (1983) Isolation of a genomic clone for bovine pancreatic trypsin inhibitor by using a unique-sequence synthetic DNA probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 80, 6838-6842
- Aubry M, Bieth J (1976) A kinetic study of the inhibition of human and bovine trypsins and chymotrypsins by the inter- α -trypsininhibitor from human plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 438, 221-230
- Battey J, Max EE, McBride WO, Swan D and Leder P (1982) A processed human immunoglobulin gene has moved to chromosome 9. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 5956-60
- Benton WD and Davis RW (1977) Screening Lambda gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* 196, 180-182
- Bieth, J, Aubry M and Travis J (1974) The interaction of human cationic trypsin and chymotrypsin II with human serum inhibitors in: *Proteinase Inhibitors* (Eds. Fritz H, Tschesche H, Greene LJ and Truscheit E) Bayer-Symposium V, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York pp. 53-62
- Birnboim HC and Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513-1523
- Bourguignon J, Diarra-Mehrpour M, Sesboue R, Frain M, Sala-Trepât JM, Martin JP and Salier JP (1985) Human inter-alpha-trypsin inhibitor: characterization and par-

tial nucleotide sequencing of a light chain-encoding cDNA. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 131, 1146-1153

Bourguignon J, Vercaigne D, Sesboue R, Martin JP, Salier JP (1983) Inter- α -trypsin inhibitor (ITI): two distinct mRNAs in baboon liver argue for a distinct synthesis of ITI and ITI derivatives. *FEBS Lett.* 162, 379-383

Boyer HW and Roulland-Dussoix D (1976) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41, 459-472.

Breathnach R, Beroist C, O'Hare K, Gannon F and Chambon P (1978) Ovalbumin gene: Evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequence at the exon-intron boundaries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4853-4857

Cameron JR, Philippsen P and Davis RW (1977) Analysis of chromosomal integration and deletion of yeast plasmids. *Nucl. Ac. Res.* 4, 1429-1448.

Carrell RW (1988) Enter a protease inhibitor. *Nature* 331, 478-479

Chawla RK, Wadsworth AD and Rudman D (1978) Relation of the urinary cancer related glycoprotein EDC1 to plasma inter- α -trypsin inhibitor. *J. Immunol.* 121, 1636-1639

Clarke L & Carbon J (1976) A colony bank containing synthetic ColEI hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9, 91-99

Creighton TE and Charles IG (1987) Sequences of the genes and polypeptide precursors for two bovine protease inhibitors. *J. Mol. Biol.* 194, 11-22

Deininger PL, Jolly DJ, Rubin CM, Friedmann T and Schmid CW (1981) Base Sequence studies of 300 nucleotide renatured repeated human DNA clones. *J. Mol. Biol.* 121, 17-23

Dietl T, Dobrinski W and Hochstrasser K (1979) Human inter- α -trypsin inhibitor. Limited proteolysis by trypsin, plasmin, kallikrein and granulocytic elastase and inhibitory properties of the cleavage products. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 1313-1318

- Doolittle RF (1985) The genealogy of some recently evolved vertebrate proteins. *Trends Biochem. Sci.* 10, 233-237
- Frischauf AM, Lehrach H, Pousteka and Murray N (1983) Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* 170, 827-842
- Fritz H, Heimbürger N, Meier M, Arnhold M, Zaneveld LJD and Schuhmacher GFB (1972) Humanakrosin: Zur Kinetik der Hemmung durch Human-Seruminhibitoren. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 1953-1956
- Fritz H, Kruck H, Russe J and Liebich HE (1979) Immunofluorescence studies indicate that the basic trypsin-kallikrein-inhibitor of bovine organs (Trasylol) originates from mast cells. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 437-444
- Fritz H and Wunderer G (1983) Biochemistry and application of aprotinin, the kallikrein-inhibitor from bovine organs. *Arzneimittel-Forschung Drug Research* 33, 479-494
- Gautreau C, Rahuel C, Cartron J-P, Lucotte G (1983) Comparison of two methods of high-molecular-weight DNA isolation from human leucocytes. *Analytical Biochemistry* 134, 320-324
- Gebhard W and Hochstrasser K (1986) Inter- α -trypsininhibitor and its close relatives in: *Proteinase inhibitors* (Eds. Barrett and Salvesen) Elsevier Science Publishers BV pp. 389-401
- Gebhard W, Leysath G and Schreitmüller T (1988) Inter- α -trypsin inhibitor is a complex of three different protein species (in press).
- Gebhard W, Schreitmüller T, Hochstrasser K and Wachter E (1988) Complementary DNA and derived aminoacid sequence of the precursor of one of the three protein components of the inter- α -trypsin inhibitor complex. *FEBS Lett.* 229, 63-67
- Halila H, Hutala ML, Schröder T, Kiviluto T and Stehman UH (1985) *Clin. Chim. Acta* 153, 209-216

Heimbürger N, Haupt H and Schwick HG (1971) in: Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors (Eds. Fritz H and Tschesche H) Walter de Gruyter, Berlin pp. 1-22

Heimbürger N and Schwick HG (1962) Thromb. Diath. Haemorrh. 7, 432

Hochstrasser K (1980) Bull. Europ. Physiopath. Resp. (Suppl.) 16, 223-230

Hochstrasser K, Albrecht GJ, Schönberger ÖL, Rasche B and Lempart K (1981c) An elastase specific inhibitor from human bronchial mucus. Isolation and characterization. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1369-1375

Hochstrasser K, Bretzel G, Feuth H, Hilla W and Lempart K (1976a) The inter- α -trypsininhibitor as precursor of the acid stable proteinase inhibitors in human serum and urine. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 153-162

Hochstrasser K, Feuth H, Fall J and Kemkes B (1974a) Klin. Wochenschrift 52, 1015-1017

Hochstrasser K, Feuth H, Kemkes B, Fall J and Werle E (1974b) Klin. Wochenschrift 52, 1018-1020

Hochstrasser K, Reichert R, Heimbürger N (1973a) Antigenic relationship between the human bronchial mucus inhibitor and plasma inter- α -trypsin inhibitor. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 587-588

Hochstrasser K, Reichert R, Schwarz S and Werle E (1973b) Detection and isolation of a second acid stable proteinase inhibitor from human bronchial mucus. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 923-926

Hochstrasser K, Reisinger P, Albrecht GJ, Wachter E, Schönberger ÖL (1984) Isolation of acid resistant urinary trypsin inhibitors by high performance liquid chromatography and their characterization by N-terminal amino-acid sequence determination. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 1123-1130

Hochstrasser K, Schönberger ÖL, Lempart K and Metzger M (1981b) Kunitz-type proteinase inhibitors derived by limited proteolysis of the inter- α -trypsin inhibitor. VI. Detection of a complex between immunoglobulin G and the inhibitory active part of the inter- α -trypsin inhibitor. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1363-1367

Hochstrasser K, Schönberger ÖL, Rossmanith I and Wachter E (1981a) Kunitz-type proteinase inhibitors derived by limited proteolysis of the inter- α -trypsin inhibitor. V. Attachments of carbohydrates in the human urinary trypsin inhibitor isolated by affinity chromatography. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1357-1362

Hochstrasser K and Wachter E (1979) Kunitz-type proteinase inhibitors derived by limited proteolysis of the inter- α -trypsin inhibitor. I. Determination of the amino acid sequence of the antitryptic domain by solid phase Edman degradation. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1285-1296

Hochstrasser K, Wachter E and Bretzel G (1976b) Identification of the acid-stable trypsin-plasmin inhibitors of the human and bovine serum as Kunitz-type inhibitors. Preliminary sequencing data. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1659-1661

Hohn B (1979). In vitro packaging of Lambda and cosmid DNA. Methods Enzymol. 68, 299-309

Hollis GF, Hieter PA, McBride OW, Swan D and Leder P (1982) Processed genes: a dispersed human immunoglobulin gene bearing evidence of RNA-type processing. Nature 296, 321-325

Horii A, Kobayashi T, Tomita N, Yamamoto T, Fukushige S, Murotsu T, Ogawa M, Mori T and Matsubara K (1987) Primary structure of human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 149, 635-641

Hunt LT and Dayhoff MO (1980) A sequencing new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin III and alpha-proteinase inhibitor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 95, 864-871

Ishii S, Xu YH, Stratton RH, Roe BA, Merlino GT and Pastan I (1985) Characterization and sequence of the promotor region of the human epidermal growth factor receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 4920-4924

Jessen TE, Faarvang KL and Ploug M (1988) Carbohydrate as covalent crosslink in human inter- α -trypsininhibitor: a novel plasma protein structure. *Febs Lett.* 230, 195-200.

Jochum M and Bittner (1983) Inter- α -trypsin inhibitor of human serum: an inhibitor of polymorphnuclear granulocyte elastase. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364, 1709-1715

Karin M, Eddy RL, Henry WM, Haley LL, Byers MG, Shows TB (1984) Human methallothionein genes are clustered on chromosome 16. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 5494-98

Karn J, Brenner S, Barnett L and Cesari G (1980). Novel bacteriophage lambda cloning vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 5172-5176

Kastern W, Björck L and Akerström B (1986) Developmental and tissue-specific expression of α_1 -microglobulin mRNA in the rat. *J. Biol. Chem.* 261, 15070-74

Kaumeyer JF, Polazzi JO, Kotick MP (1986) The mRNA for a proteinase inhibitor related to the HI-30 domain of inter- α -trypsin inhibitor also encodes α_1 -microglobulin (protein HC). *Nucl. Acids Res.* 14, 7839-7850

Kelley PM and Schlesinger MJ (1982) *Mol. Cell. Biol.* 2, 267-274

Kingston IB and Anderson S (1986) Sequences encoding two trypsin inhibitors occur in strikingly similar genomic environments. *Biochemical J.* 233, 2, 443-450

Kitaguchi N, Takahashi Y, Tokushima Y, Shiojiri S and Ito H (1988) Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 331, 530-32

Lacy E and Maniatis T (1980) The nucleotide sequence of a rabbit β -globin pseudogene. *Cell* 21, 545-553

Lai EC, Kao F-T, Law ML and Woo SLC (1983) Assignment of the α_1 -antitrypsin gene and a sequence related gene to human chromosome 14 by molecular hybridization. *Ann J. Hum. Genet.* 35, 385-392

Laskowski MJr and Sealock RW (1971). in: *The Enzymes*, 3rd. ed., 375-473

Laskowski M, Kato Jr and J (1980) Protein Inhibitors of Proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 593-626

Laskowski M, Jr (1986) Protein inhibitors of serine proteinases-mechanism and classification in: *Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors in foods* (ed. Friedman M.) Plenum Press, New York

Laskowski MJr, Kato I, Ardelt W, Cook J, Denton A, Empie MW, Kohr WJ, Park SJ, Parks K, Schatzley BL, Schönberger Oel, Tashiro M, Vichot G, Whatley HE, Wieczorek A and Wieczorek M (1987) Ovomucoid third domains from 100 avian species: Isolation, sequences, and hypervariability of enzyme-inhibitor contact residues. *Biochemistry* 26, 202-221

Leder P, Hansen JN, Konkel D, Leder A, Nishioka Y and Talkington C (1980) Mouse globin system: A funtional and evolutionary analysis. *Science* 209, 1336-1342

Lewin B (1987) *Genes III*. John Wiley & Sons. New York

Little PFR (1982) Globin pseudogenes. *Cell* 28, 683-684

Long GL, Chandra T, Woo SLC, Davie EW and Kurachi K (1984) Complete sequence of the cDNA for human α_1 -anti-trypsin and the gene for the S variant 23, 4828-4837

Matsuda K, Ogawa M, Murata A, Kitahara T and Kosaki G (1983) *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 40, 301-305

Matsuda K, Ogawa M, Shibata T, Nishibe S, Miyauchi K, Matsuda Y and Mori T (1985) *Ann. J. Gastroent.* 80, 694-698

Maniatis T, Fritsch EF and Sambrock J (1982) *Molecular clonong: a laboratory manual*. Cold spring Harbour Labora-

tory, Cold Spring Harbour, New York

Maruyama M, Yamamoto T, Sumi H, Tsushima H, Mihara H and Minamino N (1986) *Enzyme* 35, 225-231

McKeehan WL, Sakagami Y, Hoshi H and McKeehan KA (1986) Two apparent human endothelial cell growth factors from human hepatoma cells are tumor-associated proteinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* 261, 5378-5383

Mendez E, Fernandez-Luna JL, Grubb A and Leyva-Cobian F (1986) Human protein HC and its IgA complex are inhibitors of neutrophil chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 1472-1475

Morii M and Travis J (1985) The reactive site of human inter- α -trypsin inhibitor is in the amino-terminal half of the protein. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366, 19-21

Neurath H (1964) Mechanism of zymogen activation. *Federation Proc.* 23, 1-7

Neurath H (1984) Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224, 350-357

Ogawa M, Matsuda K, Shibata T, Matsuda Y, Ukai T, Ohta M and Moi T (1985) *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 50, 259-266

Patel PJ, Framson PE, Caskey CT and Chinault AC (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6, 393-403

Pejaudier L, Kichemi V, Andran R and Steinbuch M (1983) Some proteins not belonging to the clotting or the kallikrein-kinin system altered by kallikrein. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364, 651-654

Ponte P, Gonzalez-De Whitt, Schilling J, Miller J, Hsu D, Greenberg B, Davis K, Wallace W, Lieberburg I, Fuller F and Cordell B (1988) A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature* 331, 525-527

Powers JC and Harper JW (1986) Inhibitors of serine proteinases in: *Proteinase Inhibitors* (eds. Barrett and

Salvesen). Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division)

Proksch GJ and Routh JI (1972) The purification of the trypsin inhibitor from human pregnancy urine. J. Lab. Clin. Med. 79, 491-499

Reid KBM and Porter RR (1981) The proteolytic activation systems of complement. Ann. Rev. Biochem. 50, 433-464

Reisinger P, Hochstrasser K, Albrecht GJ, Lempart K, Salier JP (1985) Human inter- α -trypsin inhibitor: localization of the Kunitz-type domains in the N-terminal part of the molecule and their release by a trypsin like proteinase. Biol. Chemistry Hoppe-Seyler 366, 479-483

Reynolds GA, Basu SK, Osborne TF, Chin DJ, Gil G, Brown MS, Goldstein JL and Luskey KL (1984) HMG CoA reductase: a negatively regulated gene with unusual promotor and 5' untranslated regions. Cell 38, 275-285

Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C and Berg P (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113, 237-251

Rudman D, Chawla RK, Hendrickson LJ, Vogler WR and Sophianopoulous AJ (1976) Isolation of a novel glykoprotein (EDC1) from the urine of a patient with acute myelocytic leukemia. Cancer Res. 36, 1837-1846

Salier JP, Diarra-Mehrpour M, Sesboue R, Bourguignon J and Martin JP (1988) Human inter- α -trypsin inhibitor. Isolation and characterization of heavy (H) chain encoding cDNA clones coding for a 383 amino acid sequence of the H chain (in press)

Salier JP, Diarra-Mehrpour M, Sesboue R, Bourguignon J, Benarous R, Ohkubo I, Kurachi S, Kurachi K and Martin JP (1987) Isolation and characterization of cDNAs encoding the heavy chain of human inter- α -trypsin inhibitor(I TI): Unambiguous evidence for multipolypeptide chain structure of ITI. Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 8272-8276

Salier JP, Sesboue R, Vercaigne D, Bourguignon J, Martin

JP (1983a) Inter- α -trypsin inhibitor (ITI): Use of new antisera for qualitative studies and discrete quantitation of ITI and its derivatives. Anal. Biochem. 133, 336-343

Salier JP, Vercaigne D, Sesboue R and Martin JP (1981) Inter- α -trypsin inhibitor (ITI): use of immunoabsorbents for preparation of anti-ITI antiserum, ITI-free human serum and purified ITI. J. Immunol. Methods 47, 239-248

Scarpulla RC (1984) Processed pseudogenes for rat cytochrome c are preferentially derived from one of three alternate mRNAs. Mol. Cell. Biol. 4, 2279-88

Schreitmüller T, Hochstrasser K, Reisinger PWM, Wachter E and Gebhard W (1987) cDNA cloning of human inter- α -trypsin inhibitor discloses three different proteins. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368, 963-970

Shimada T, Chen MJ, Nienhuis Aw (1984) Gene 31, 1-8

Sorger PK, Pelham HRB (1988) Cloning and Expression of a gene encoding hsc73, the major hsp70 like Proteins in unstressed rat cells. in press.

Southern E (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517

Subjeck JR and Shyy T (1986) Stress proteins systems of mammalian cells. Am. J. Physiol. 250, c1-c17.

Steinbuch M (1976) The Inter- α -trypsin inhibitor in: Methods in Enzymology (Laszlo Lorand ed.) XLV, B, 760-772

Steinbuch M, Andran R, Reuge C and Blatrix C (1966) Etude d'une α -globuline contenant du zinc: la protéine . Protides Biol. Fluids 14, 185-188

Steinbuch M and Loeb (1961) Isolation of an α_2 -globulin from human plasma. Nature 192, 1196

Steinmetz M (1984) Trends in Biochem. Sci. 8, 224-226
Titel

Steinmetz M, Winoto A, Minard K and Hood L (1982) Cell 28, 489-498

Tanzi RE, McClatchey AJ, Lamperti ED, Villa-Komaroff L, Gusella JF and Neve RL (1988) Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. Nature 331, 528-530

Tejler L, Eriksson S, Grubb AO and Astedt B (1978) Production of protein HC by human fetal liver explants. Biochim. Biophys. Acta 542, 506-514

Travis J and Salvesen GS (1983) Human plasma proteinase inhibitors. Annu. Rev. Biochem. 52, 655-709

Ueda S, Nakai S, Nishida Y, Hisajima H and Honjo T (1982) Long terminal repeat-like elements flank a human immunoglobulin epsilon pseudogene that lacks Introns. EMBO J. 1, 1539-44

Vanin EF, Goldberg GJ, Tucker PW and Smithie O (1980) A mouse alpha globin-related pseudogene ($\psi\alpha$ 30.5) lacking intervening sequences. Nature 286, 222-226

Vaupel P (1982) in: Tumor blood circulation: Angiogenesis, vascular morphology and blood flow of experimental and human tumors (ed. Peterson H.), Boca Raton, FL: CRC

Vieira J and Messing J (1982) The pUC plasmid, an M13 mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19, 259-268

Von Heijne G (1983) Patterns of aminoacids near signal-sequence cleavage sites. Eur. J. Biochem. 133, 17-21

Wachter E, Hochstrasser K, Bretzel G and Heindl S (1979) Kunitz-type proteinase inhibitors derived by limited proteolysis of the inter- α -trypsin inhibitor. II. Characterization of a second inhibitory inactive domain by amino acid sequence determination. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1297-1303

Wachter E, Hochstrasser K (1979) Kunitz-type inhibitors derived by limited proteolysis of the inter- α -trypsin inhibitor. III. Sequence of the two Kunitz-type domains

inside the native inter- α -trypsin inhibitor, its biological aspects and also of its cleavage products. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1305-1311

Wachter E, Hochstrasser K (1981) Kunitz-type inhibitors derived by limited proteolysis of the inter- α -trypsin inhibitor. IV. The amino acid sequence of the human urinary trypsin inhibitor isolated by affinity chromatography. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1351-1355

Weiner AM, Deininger PL, Efstradiatis A (1986) Nonviral retroposons: genes, pseudogenes and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. Ann. Rev. Biochem. 55, 631-61

Weiss EH, Golden L, Fahrner K, Mellor AL, Devlin JJ, Bullman H, Tiddens H, Bud H and Flavell RA (1984) Organization and evolution of the class I gene family in the major histocompatibility complex of the C57BL/10 mouse. Nature 310, 650-655

Wilbur WJ and Lipman DJ (1983) Rapid similarity searches of the nucleic acid and protein data banks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 726-730

Wiman B and Collen D (1978) Molecular mechanisms of physiological fibrinolysis. Nature 272, 549-550

Yamamoto H, Nata K and Okamoto H (1986) Mosaic evolution of prepropancreatic polypeptide. J. Biol. Chem. 261, 6156-6159

Yamamoto T, Nakamura Y, Nishide T, Emi M, Ogawa M, Mori T and Matsubara K (1985) Molecular cloning and nucleotide sequence of human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) cDNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 132, 605-612

Abkürzungsverzeichnis

abs	absolut
bp	Basenpaare
cos	kohäsive Enden
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
h	Stunde(n)
ITI	Inter-alpha-Trypsininhibitor
kb	Kilobasenpaare
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
n. d.	nicht detektiert
pfu	plaque forming unit
OD	Optische Dichte
PEG	Polyethylenglykol
Pos.	Position
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SKT	Skalenteile
ün	über Nacht
zentr.	zentrifugiert

Lebenslauf

Name: Kögler
Vorname: Manuela Maria
Geburtsdatum: 13.02.1958
Geburtsort: Karlsruhe
Name des Vaters: Kögler, Erich geb. 2.07.1930
verstorben: 24.07.1988
Beruf: Verwaltungsangestellter
Name der Mutter: Kögler, Maria geb. Thiel
geb. 24. 09.1932
Staatsangehörigkeit: deutsch
Ausbildung: 1965-1968 Grundschule: Aue, Baden-
Württemberg

1968-1977 Gymnasium: Durlach,
Baden-Württemberg

1977-1983 Studium der Biologie an
der Universität Karlsruhe (TH)

1983-1984 Diplomarbeit im Institut
Botanik I unter der Anleitung von
PD Dr. K. Grimm
Thema: "Mikrobiologische Untersu-
chungen an Asbestzementrieselplat-
ten aus einem Naßkühlturm"

Aug. 1984-Okt. 1988 Erstellung der
vorliegenden Dissertation in der
Abteilung für Klinische Chemie und
Klinische Biochemie in der Chirur-
gischen Klinik Innenstadt der Uni-
versität München
(Leitung: Prof. Dr. H. Fritz)

Nov. 1986-Mai 1987 Gastaufenthalt
im Max-Planck-Institut für Bioche-
mie Abtlg. Prof. Dr. Dr. P. H.
Hofschneider in Martinsried

